

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**E.A.P. DE ODONTOLOGÍA**

**Efectividad de la asociación cetrimida-clorhexidina  
15% / 0.15% frente a clorhexidina 2% en la  
erradicación de biofilms de *Enterococcus faecalis***

**TESIS**

**Para obtener el Título Profesional de Cirujano Dentista**

**AUTOR**

**Djasmin Porturas Araujo**

**ASESOR**

**Doris Elizabeth Salcedo Moncada**

**Lima - Perú**

**2011**

## **DEDICATORIA**

*Mi gratitud al Todo Poderoso, que me favorece en todo momento , por la luz en mi camino, la Familia que nunca me desampara y los Amigos que alegran mi existir*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a DIOS por nunca desampararme y darme la fortaleza de avanzar aunque el camino se ponga difícil y por presentarme grandes personas en mi vida que me consideran y apoyan

Esas grandes personas son:

MI MAMA, MI HERMANA, CHIBI Y MI ABUELITA (ahora postradita, pero con ganas de vivir); ellas me dan su amor y apoyo incondicional

A mis amigos verdaderos: Maira, Víctor y Chatu por irradiarme su madurez.

A mi teacher Ronnie Pretorius, Eva, Fiorella, Gandhi y Omar con los cuales compartí muy feliz y casi a diario todo el 2010 y parte del 2011; los quiero como a mis hermanitos. (*I fond of you. You will be in my heart forever*)

Muchísimas Gracias al Laboratorio Bioservice, al Dr Arnaldo a Karina (mi asesora microbióloga), Leslie, Rocío y también a Roberto; por permitirme ejecutar mi tesis en sus Instalaciones y proveerme de todos los insumos para la misma.

Gracias a los que confiaron en mí por darme trabajo y así poder formalizar mi carrera.

Muchas Gracias también a los que me hicieron pasarla no tan bien, porque de las caídas me puse más fuerte y con las fuerzas para volver a levantarme y seguir en el camino.

## RESUMEN

El propósito de este estudio fue determinar la efectividad de la asociación de Cetrimida -Clorhexidina (15% / 0.15%) frente a Clorhexidina 2%; en la erradicación de biofilms de *Enterococcus faecalis* in vitro.

La metodología usada para este fin fue la creación de biofilms, en láminas portaobjeto de 48 horas de incubación a 37 °C en condiciones aerobias a partir de la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 en caldo BHI, las cuales fueron sometidas a los irrigantes testados durante los periodos de tiempo de 1, 3 y 5 minutos, respectivamente. Se llevaron a cabo dos grupos de experimentos independientes, más un control negativo (suero fisiológico); en tres repeticiones para cada irrigante y tiempo evaluado. Los irrigantes evaluados fueron: Cetrimida-Clorhexidina (15%/0.15%) "SAFEBLON", Clorhexidina (2%), y Suero Fisiológico. Luego del contacto con los irrigantes, los biofilms fueron sembrados en Agar Tripticasa Soya (TSA) e incubados durante 24 horas a 37 °C para la cuantificación final de UFC/mL y así determinar el porcentaje de inhibición bacteriana y consecuentemente la efectividad de los irrigantes.

El resultado obtenido muestra que, el porcentaje de inhibición bacteriana de Biofilms de *Enterococcus faecalis* con Cetrimida-Clorhexidina (15%/0.15%) fue 99,99%; con Clorhexidina (2%), fue 100% y con Suero Fisiológico(control negativo) fluctuó entre 24% y 31%; durante los tiempos evaluados de 1,3 y 5 minutos.

Por lo tanto, se concluye que no existe diferencia significativa en la Erradicación de biofilms de *Enterococcus faecalis*; mediante la aplicación de la asociación Cetrimida-Clorhexidina (15%/1.5%) y Clorhexidina 2% a cualquiera

de los tres tiempos experimentados; permitiéndose utilizar indistintamente menor concentración de Clorhexidina de 2% al 0.15% , mediante el uso coadyuvante de Cetrimida 15%.

**Palabras Clave:** Cetrimida, Surfactante, biofilms, *Enterococcus faecalis*, tensión superficial

## SUMMARY

The purpose of this study was to determine the effectiveness of the association of Cetrimide-Chlorhexidine 15%/0.15% with Chlorhexidine 2% in the eradication of biofilms of *Enterococcus faecalis* in vitro.

The used methodology for this aim was the creation of biofilms in glass slides for 48 hours of incubation at 37 °C, in aerobic conditions from *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 strains in BHI infusion. They were subjected to the tested irrigants during the periods of 1, 3 and 5 minutes, respectively. There were two groups of independent experiments and a negative control with saline solution in three repetitions for each irrigant and time tested. The tested irrigants were Cetrimide/ Chlorhexidine 15%/015%, (SAFEBLON) , Chlorhexidine 2% and physiological saline. After the contact with the irrigants , biofilms were cultivated in TSA agar and incubated during 24 hours at 37 °C for the quantification of the UFC/mL and determine the percentage of bacterial inhibition and consequently the percentage of the irrigants effectiveness.

The results obtained show that the obtained percentage of bacterial inhibition of *Enterococcus faecalis* biofilms with Cetrimide - Chlorhexidine (15%/0.15%)

was 99,99% ; with Chlorhexidine (2%), was at 100% and with Physiological Saline (negative control) ranged between 24% and 31%; during three tested times : 1,3 and 5 minutes.

Therefore, It concluded that there is no significant difference in the eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms; by the application of the association Cetrimide-Chlorhexidine (15%/ 0.15%) and Chlorhexidine 2% at any of the three tested times; allowing to use indistinctly less concentration of Chlorhexidine from 2% to 0.15% by the adjuvant use of Cetrimide 15%.

**Keywords:** Cetrimide, surfactant, biofilms, *Enterococcus faecalis*, surface tension

## INDICE

<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>12</b>
<b>II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b>	
2.1. Area problema	14
2.2. Delimitación del problema	15
2.3. Formulación del problema	15
2.4. Objetivos de la investigación	
2.4.1. Objetivos generales	15
2.4.2. Objetivos específicos	16
2.5. Justificación de la investigación	16
2.6. Limitaciones de la investigación	17
<b>III. MARCO TEÓRICO</b>	
3.1. Antecedentes del Problema	18
3.2. Bases Teóricas	21
ENTEROCOCCUS <i>faecalis</i>	21
-Enterococcus <i>faecalis</i> como patógeno del sistema de conductos radiculares	21
-Prevalencia de Enterococcus <i>faecalis</i> en Infecciones de Conductos radiculares	23
-Formas de crecimiento	24

-Biofilms o Biopelículas de Enterococcus faecalis	25
Soluciones Irrigantes en la Terapia Endodóntica	30
-Actividad Antimicrobiana de las soluciones irrigantes frente a biofilms de Enterococcus faecalis	30
-CLORHEXIDINA	30
-Propiedades	31
-Mecanismos de Acción	33
-Usos de la Clorhexidina en Endodoncia	34
-AGENTES SURFACTANTES	34
-Tensión Superficial	34
-Tensoactividad	35
-Clasificación	35
-Propiedades	36
-Agentes Humectantes o Mojadores	36
-Adsorción de surfactantes: Interfase SOL-LIQ	37
-Mecanismos de Adsorción	37
-Acción Antibacteriana de Tensoactivos	38
-SURFACTANTE CATIÓNICO	39
-Surfactante Catiónico en Endodoncia	41



-Amonio Cuaternario	42
-CETRIMIDA	43
-Propiedades Bioquímicas	44
-Mecanismos de Acción	45
-Usos y Aplicaciones	46
-Ventajas	47
3.3. Definición de términos	48
3.4. Hipótesis	48
3.5. Operacionalización de variables	49
<b>IV. DISEÑO METODOLÓGICO</b>	
4.1. Tipo de Investigación	50
4.2. Población y Muestra	50
4.3. Material y Método	51
4.4. Procedimientos y Técnicas	54
4.5. Procesamiento de Datos	62
4.6. Análisis de Resultados	62
<b>V. RESULTADOS</b>	63
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	71
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	73

<b>VIII.RECOMENDACIONES</b>	<b>74</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>75</b>
<b>X. ANEXOS</b>	<b>80</b>
10.1 INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS	81
10.2 PROTOCOLO DE EXPERIMENTACIÓN	82
10.3 TABLAS, CUADROS Y GRÁFICOS	83

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Formación de biofilms	<b>26</b>
<b>FIGURA 2</b>	Ángulos de Contacto	<b>36</b>
<b>FIGURA 3</b>	Materiales de Laboratorio	<b>54</b>
<b>FIGURA 4</b>	Cepa de <i>Enterococcus faecalis</i>	<b>54</b>
<b>FIGURA 5</b>	Preparación de Medios de Cultivo	<b>57</b>
<b>FIGURA 6</b>	Turbidez del Medio	<b>58</b>
<b>FIGURA 7</b>	Diluciones seriadas	<b>59</b>
<b>FIGURA 8</b>	Diez diluciones	<b>59</b>
<b>FIGURA 9</b>	Preparación de Láminas porta-objeto	<b>60</b>
<b>FIGURA 10</b>	Cámara de flujo laminar	<b>60</b>
<b>FIGURA 11</b>	Obtención de biofilms	<b>61</b>
<b>FIGURA 12</b>	Inoculación de la cepa de <i>Enterococcus faecalis</i> al medio de cultivo líquido: Infusión Cerebro-Corazón (BHI)	<b>83</b>
<b>FIGURA 13</b>	Formación de biofilms	<b>84</b>
<b>FIGURA 14</b>	Cuantificación con método de diluciones seriadas	<b>85</b>
<b>FIGURA 15</b>	Cuantificación de UFC/mL antes de ser expuestas a los irrigantes	<b>86</b>
<b>FIGURA 16</b>	Esterilización de vasos con luz UV	<b>86</b>
<b>FIGURA 17</b>	Irrigantes: Clorhexidina, Cetrimida / Clorhexidina	<b>87</b>
<b>FIGURA 18</b>	Enfrentamiento de biofilms a los irrigantes	<b>87</b>
<b>FIGURA 19</b>	Lectura final de UFC/mL	<b>89</b>

## INDICE DE CUADROS

<b>CUADRO 1</b>	Resultados obtenidos con Cetrimida-Clorhexidina 15%/0.15%	<b>64</b>
<b>CUADRO 2</b>	Resultados obtenidos con Clorhexidina 2%	<b>65</b>
<b>CUADRO 3</b>	Resultados obtenidos con Control Negativo	<b>66</b>
<b>CUADRO 4</b>	Comparación de inhibición bacteriana a 1 minuto	<b>67</b>
<b>CUADRO 5</b>	Comparación de inhibición bacteriana a 3 minutos	<b>68</b>
<b>CUADRO 6</b>	Comparación de inhibición bacteriana a 5 minutos	<b>69</b>
<b>CUADRO 7</b>	Efectividad en los tres tiempos evaluados, según irrigantes	<b>70</b>

## I. INTRODUCCION

Las bacterias asociadas con la infección persistente de conductos radiculares pueden comprender una o pocas especies. La más importante es *Enterococcus faecalis*. Su resistencia reside ampliamente en su capacidad de crecer como biofilms en las paredes del conducto radicular. Los biofilms son comunidades microbianas de células adheridas y embebidas en sus propios polímeros extracelulares (EPS). Esta matriz de polímeros brinda la estabilidad mecánica al biofilm; mientras que al mismo tiempo puede impedir algún contacto directo de agentes antimicrobianos en los microorganismos, por tanto disminuyendo la eficacia de tales agentes. Varias soluciones irrigantes pueden ser usadas durante el tratamiento de conductos radiculares infectados. Esto requiere entre otras propiedades, de la actividad antimicrobiana. La Clorhexidina es un irrigante que es más efectivo contra cultivos planctónicos que biofilms, como lo son otros agentes antimicrobianos. Por lo tanto son necesarias estrategias para remover el biofilm, que no son solo activas contra microorganismos sino también que tengan un efecto en la matriz de EPS. Los surfactantes catiónicos son potentes agentes antimicrobianos que han mostrado acción en componentes del Biofilm, dependiendo de la estructura química de la molécula. La adhesión electrostática con la matriz de EPS puede aumentar la elasticidad o debilitamiento de las fuerzas cohesivas del biofilm. La cetrimida es un surfactante catiónico que ha demostrado capacidad de disminuir la estabilidad mecánica del biofilm. Su uso en el tratamiento de los canales radiculares es frecuentemente asociado con otros irrigantes.

En realidad, la combinación de Cetrimida y Clorhexidina han demostrado actividad antimicrobiana contra cultivos planctónicos de *Enterococcus faecalis*. Un estudio previo reportó que Clorhexidina al 2% fue menos eficiente que Smearclear (el cual contenía cetrimida entre otros componentes) contra biofilms de *Enterococcus faecalis*; pero a la fecha, la adición de cetrimida (solo o asociado con Clorhexidina) en biofilms de *Enterococcus faecalis* es desconocido.

Por esta razón, el objetivo del presente estudio fue valorar la efectividad de Cetrimida y Clorhexidina; solo y en asociación en la erradicación de biofilms de *Enterococcus faecalis* a través de ensayos a diferentes tiempos de exposición.

## II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### 2.1 AREA PROBLEMA

Han sido muchas las soluciones irrigantes propuestas para el uso en endodoncia, y la gran mayoría han sido evaluadas in vitro para conocer su actividad frente a bacterias en suspensión o planctónicas<sup>1</sup>. Sin embargo, esta forma de crecimiento no representa las condiciones reales que las bacterias se organizan formando biofilms en las paredes de los conductos radiculares<sup>2</sup>. Esto podría tener una repercusión clínica importante ya que, se ha demostrado que los microorganismos que crecen en Biopelículas son más resistentes que cuando lo hacen en forma planctónica. Por este motivo, los estudios más recientes se han dirigido a evaluar la eficacia de las soluciones irrigantes frente a biofilms microbianos, de modo que estos resultados se acercarán más a una realidad clínica de comportamiento<sup>3,4,5,6,7,8</sup>. En esta Investigación se ha seleccionado a la bacteria *Enterococcus faecalis* por ser una de las bacterias aisladas con mayor frecuencia en las infecciones de fracasos endodónticos. Recientemente se han desarrollado soluciones irrigantes que contienen además de antimicrobianos, agentes surfactantes que modifican la tensión superficial del compuesto. El bromuro de cetil-trimetil amonio o cetrimida es un surfactante catiónico que posee propiedades bactericidas<sup>9</sup> y fungicidas<sup>10</sup>, además de haber mostrado sinergismo con la clorhexidina.

## **2.2 DELIMITACIÓN**

Esta investigación pretende evaluar las soluciones irrigantes alternativas como el bromuro de cetil trimetil amonio (cetrimida) para comprobar su efecto coadyuvante o potenciador con la Clorhexidina en la erradicación de Biofilms de *Enterococcus faecalis*. Siendo muy escasos los estudios que evalúan los efectos de cetrimida sobre Biofilms de *Enterococcus faecalis*, se simulará un modelo representativo y simple que se asemeje a la realidad del crecimiento y desarrollo de la bacteria en Biofilms de los conductos radiculares

## **2.3 FORMULACION DEL PROBLEMA:**

¿Cuál es la efectividad de la asociación de Cetrimida-Clorhexidina al 15%/0.15% en comparación con la Clorhexidina 2% en la erradicación de biofilms de *Enterococcus faecalis* ?

## **2.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **2.4.1 OBJETIVO GENERAL:**

- Determinar la efectividad de la asociación de Cetrimida-Clorhexidina 15% /0.15% en comparación con la Clorhexidina 2% en la erradicación de biofilms de *Enterococcus faecalis* in vitro.



#### 1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la efectividad de la asociación de Cetrimida-Clorhexidina 15% / 0.15% en la erradicación de biofilms de *Enterococcus faecalis* in vitro.
- Evaluar la efectividad de Clorhexidina al 2.0% en la erradicación de biofilms de *Enterococcus faecalis* in vitro.
- Comparar la efectividad entre la asociación Cetrimida - Clorhexidina 15%/ 0.15% y Clorhexidina 2% en la erradicación de Biofilms infectados con *Enterococcus faecalis* in vitro.

#### 2.5 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La evidencia de fracasos endodónticos debido a la presencia de *E. faecalis* y su crecimiento en Biofilms en el sistema de conductos radiculares de las piezas dentales evita el ingreso de los irrigantes convencionales para erradicar a estos patógenos. Por tanto la eliminación de esta bacteria asegurará un mejor pronóstico en el éxito de los tratamientos de conductos. La preparación biomecánica requiere de un elemento auxiliar que viene a ser la irrigación. El irrigante podrá tener propiedades de lavado mecánico, agente bactericida, solvente de tejidos y lubricante. Pero si la tensión superficial del irrigante no es lo suficientemente baja no podrá ingresar al sistema de conductos radiculares para cumplir su función.

Los “nuevos irrigantes” (agentes surfactantes o tensoactivos) disminuyen la tensión superficial de los irrigantes, permitiendo el ingreso de estos al sistema de los túbulos dentinarios, a los Biofilms de *Enterococcus faecalis* y a la vez

produciendo un efecto sinérgico con los irrigantes convencionales como es el caso de la Clorhexidina. Por tal motivo en la presente investigación se utilizará el surfactante CETRIMIDA (CETAB) asociado a la Clorhexidina 0.15% para comprobar la mayor efectividad en la erradicación de biofilms infectados con *Enterococcus faecalis*.

Esta investigación permitirá al estomatólogo tener una alternativa más en el momento de la elección de una solución antiséptica que conlleve al éxito del tratamiento radicular y la satisfacción del paciente en mérito a la mejora de su salud oral.

## 2.6 LIMITACIONES

Escasez de literatura relacionada con el uso de Cetrimida (CETAB) en endodoncia.

La comercialización de Cetrimida es muy poco difundida y conocida en Perú, aunque se encuentra comercializándose asociada a Clorhexidina como “SAFE BLÓN” (Cetrimide-Clorhexidina 15% / 0.15%).

El modelo de simulación de biofilms empleado es un sistema de preparación simple y económico; que proporciona la máxima superficie de exposición del biofilm a los irrigantes. Sin embargo el acceso físico al biofilm en la estructura dentaria in vivo, es diferente.

### III.- MARCO TEORICO

#### 3.1 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

**Peciulienė y cols , 2001<sup>11</sup>** , aislaron bacterias en dieciséis dientes antes de la instrumentación y en cinco dientes después de la instrumentación e irrigación , donde tres de los cinco conductos contenían *Enterococcus faecalis* en cultivo puro y uno en cultivo mixto

**Chávez de Paz y cols, 2003,<sup>12</sup>** Lograron aislar 248 especies en 107 dientes de un total de 200 piezas dentarias con antecedente, evidencia clínica y radiográfica de periodontitis apical crónica después de realizar tratamiento endodóntico antimicrobiano; mostrando que una vez establecidos microorganismos: *Streptococcus* no mutans, *Enterococcus* y *Lactobacillus*, estos fueron capaces de sobrevivir en el conducto radicular.

Se han desarrollado diversas técnicas para el estudio del efecto antimicrobiano de las soluciones irrigantes frente a biofilms. Entre ellas, las descritas por:

**Spratt y cols<sup>7</sup>, 2001; Abdullah y cols<sup>13</sup>. 2005; Hems y cols<sup>14</sup>. 2005; Sena y cols<sup>15</sup>. 2006; Giardino y cols<sup>16</sup>. 2007; Bryce y cols<sup>17</sup>. 2008;** quienes formaron biofilms en filtros de membrana de nitrato de celulosa, inoculados con una suspensión bacteriana, y posteriormente expuesto a los irrigantes . A pesar

de ser el método más utilizado, tiene la desventaja de formar biofilms de manera estática.

**Dunavant y cols.<sup>4</sup>, 2006**, generaron biofilms en dispositivo de fluido continuo, inoculando cultivos de *E. faecalis*, creando ocho biofilms simultáneos.

**Duggan y Sedgley<sup>18</sup>, 2007**, desarrollaron biofilms en pocillos de placas de microtiter inoculadas con suspensión bacteriana con la desventaja de que la eliminación del contenido de los pocillos podría favorecer posibles alteraciones del biofilm, así como la mezcla de antisépticos, dando resultados falsos.

**Anne Williammson y cols.<sup>11</sup>, USA 2009**, utilizaron el modelo de Biofilms que consistía en crear biofilms en delgadas y pequeñas láminas de vidrio estéril (porta-objetos de cristal), inoculados con suspensión bacteriana; aportando un método sencillo y económico de replicar.

Desde el punto de vista de la eficacia de los irrigantes:

**Cameron, 1986,<sup>19</sup>** documentó que la eficiencia de un irrigante endodóntico puede mejorar reduciendo su tensión superficial o incrementando la fluidez sobre las paredes del canal radicular.

**Fügen Taşman, 2000,<sup>20</sup>** determinó que el Cetrexidin®, (Clorhexidina 0.2%, asociado a Cetrimida 0.2%) obtuvo la más baja tensión superficial al compararlo con otras soluciones de uso odontológico. Por tanto; un agente

con baja tensión superficial tiene la ventaja de penetrar los túbulos dentinarios de con mayor facilidad.

**Portenier y cols, 2006<sup>21</sup>** estudiaron la actividad antimicrobiana frente a *E. faecalis* en suspensión y determinaron que la combinación de clorhexidina y cetrimida 0,1%/0,1% y 0.01%/0.01% erradicaron al *E. faecalis* tras 30 s de exposición.

**M. Teresa Arias Solís , España 2009,**<sup>22</sup> obtuvo como conclusión en su tesis doctoral, mediante un estudio in vitro, en el sistema MBEC™ HTP para la formación de biofilms, que Cetrimide erradicó las biofilms de *E. faecalis* a partir de los 30 segundos de exposición, cuando se combino con clorhexidina ya que se potenció su capacidad para erradicarlas.

**Onçag y cols.,<sup>23</sup> 2003,** compararon las propiedades antibacterianas y la toxicidad entre: NaOCl 5.25%, Gluconato de Clorhexidina 2% y Cetrexidin® (Clorhexidina 0.2% con Cetrimida 0.2%).El estudio se llevo a cabo in vitro, en dientes decíduos; concluyendo que el Cetrexidin y Clorhexidina al 2% fueron los más efectivos ya que demostraron: mayores efectos residuales , mayor actividad bactericida y menor toxicidad que la solución de NaOCl al 5.25%

### **3.2 BASES TEÓRICAS**

#### **ENTEROCOCCUS FAECALIS**

#### **ENTEROCOCCUS FAECALIS COMO PATÓGENO DEL SISTEMA DE CONDUCTOS**

El término Enterococo fue utilizado por primera vez en 1899 por Thiercelin, para referirse a un diplococo grampositivo encontrado en el intestino humano. En el mismo año Mac Callum y Hastings describieron un caso de Endocarditis atribuido a un microorganismo que ellos llamaron Micrococcus Zymógenes, y que posteriormente se identificó como Enterococcus hemolítico.

La denominación de Streptococcus faecalis fue acuñada por Andrewes y Horder<sup>24</sup> en 1906, para designar a un microorganismo aislado de un paciente con Endocarditis, aludiendo el nombre específico a su hábitat, el intestino. Desde entonces se han mantenido diferentes opiniones sobre la clasificación de esta bacteria, que han estado relacionadas con la polémica en torno a la clasificación del género Streptococcus. Hasta comienzos de los 80, parte de los microorganismos del grupo D de Lancefield fueron designados como Enterococcus, término que engloba a las especies de S faecalis, S faecium, S. avium, S. gallinarum y algunas otras menos aceptadas. En 1984, Schleifer y Kilpper-Balz<sup>25</sup> propusieron la inclusión de las especies S faecalis y faecium a un nuevo grupo, el género Enterococcus.

Actualmente se reconocen formalmente 32 especies de *Enterococcus*, estableciéndose cinco grupos en función a la interacción con el manitol, sorbitol y arginina.

Los enterococos son cocos grampositivos que se visualizan como células aisladas, en parejas o bien en cadenas cortas. Son anaerobios facultativos, ya que, aunque carecen de catalasa, poseen superóxido dismutasa y peroxidasa que eliminan el  $O_2$  y el  $H_2O_2$ , respectivamente, que se generan en condiciones de anaerobiosis<sup>26</sup>. Catabolizan una gran variedad de fuentes energéticas incluyendo carbohidratos, glicerol, lactato, malato, citrato, arginina, agmatina y aceto-ácidos<sup>27</sup>. Los enterococos sobreviven en condiciones ambientales muy adversas, de modo que soportan niveles de pH 9.6 como elevadas concentraciones de NaCl<sup>18</sup>. Son resistentes a las sales biliares, detergentes, metales pesados, etanol, azida y sobreviven a la desecación. Crecen entre 10 y 45°C y sobreviven a 60° C durante 30 minutos<sup>28</sup>.

*E. faecalis* es la especie más representativa y significativa del género *Enterococcus*; constituye un patógeno oportunista implicado en la persistencia de la infección, influyendo en pronóstico del tratamiento de conductos. Se aísla frecuentemente en infecciones endodónticas refractarias<sup>23</sup> gracias a la gran variedad de factores de virulencia: enzimas líticas, citolisinas, sustancias de agregación, feromonas y ácidos lipoteicoicos.<sup>29</sup> Pueden adherirse a las células del hospedador y expresar proteínas que compiten con otras células alterando la respuesta del mismo.<sup>29</sup> Además es capaz de suprimir la acción de los linfocitos lo cual contribuye potencialmente al fracaso del tratamiento de conductos. Sin embargo, la resistencia de esta bacteria no

depende tanto de sus factores de virulencia como de su capacidad de sobrevivir y persistir como patógeno en el interior de los conductos radiculares, lo que consigue por:

1. Presentar gran variedad de polimorfismos genéticos
2. Producir gelatinasa y proteínas de unión al colágeno (Ace) que ayuda a unirse a dentina.
3. Tamaño suficientemente pequeño como para invadir así como vivir en los túbulos dentinarios.
4. Puede subsistir largas temporadas de escasez de nutrientes y utilizar el suero como fuente de alimento. Además, el suero procedente del hueso alveolar y del ligamento periodontal le sirve de ayuda para unirse al colágeno tipo I<sup>30</sup>
5. Resiste a la medicación intraconducto con hidróxido de calcio durante más de 10 días en el interior de los túbulos dentinarios<sup>31</sup>
6. Por último, crece formando biofilms siendo hasta 1000 veces más resistente a la fagocitosis, anticuerpos y antimicrobianos que cuando crece en forma planctónica<sup>32</sup>.

## **PREVALENCIA DEL ENTEROCOCCUS FAECALIS EN INFECCIONES DEL CONDUCTO RADICULAR**

*E. faecalis* es un microorganismo que forma parte de la microbiota del hombre y se encuentra comúnmente en la cavidad oral. La prevalencia es mayor en pacientes que están recibiendo un tratamiento o re-tratamiento endodóntico, en comparación con aquellos que no están siendo tratados<sup>33</sup>.



Se aísla tanto en infecciones endodónticas primarias como en secundarias o persistentes<sup>34</sup>. En las infecciones primarias se encuentra entre un 4 - 40 % y su presencia se asocia a periodontitis apicales crónicas asintomáticas que a periodontitis apicales agudas y abscesos periapicales : La presencia de *E. faecalis* en infecciones endodónticas secundarias es 9 veces mayor que en las primarias y la prevalencia oscila entre 24-77 %<sup>35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42</sup>. Este amplio rango se debe a las diferentes formas de identificación y tamaño de la muestra. <En la mayoría de estos estudios la identificación se ha llevado a cabo mediante técnicas de cultivo y la prevalencia con estos medios ha sido entre un 24 -70 % . Otros autores han usado técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa(PCR) siendo la prevalencia del enterococo mayor (67-77%) debido a que son técnicas más sensibles, más rápidas y seguras que los cultivos. La mayor prevalencia en dientes con fracaso endodóntico pone de manifiesto su habilidad para sobrevivir en condiciones ambientales duras como las existentes en dichas situaciones. Además ha sido encontrado con frecuencia como el único microorganismo presente en conductos obturados con lesiones periapicales.

## **FORMAS DE CRECIMIENTO**

Dependiendo de las condiciones ambientales, una misma bacteria puede crecer sésil, adherida a una superficie o de forma planctónica. Durante décadas, el estudio de la actividad antimicrobiana de las soluciones irrigantes frente a microorganismos implicados en infecciones endodónticas se ha

llevado a cabo en cultivos planctónicos o en suspensión. Este cultivo tradicional se basa en la inoculación de una bacteria en un caldo, en el que las bacterias disponen de oxígeno y alimento de manera uniforme. En estas condiciones óptimas de crecimiento, las bacterias se encuentran nadando libremente en el medio líquido. Sin embargo, estas condiciones no reflejan las circunstancias reales en que las bacterias crecen, ya que se organizan formando biofilms en las paredes de los conductos radiculares<sup>2</sup>. Posiblemente, la primera identificación de biofilms en conductos radiculares infectados se deba a Nair<sup>2</sup> quien examinó el contenido de los conductos de 31 dientes, que tenían caries coronales y procesos inflamatorios periapicales, mediante microscopía electrónica de transmisión. En ellos observó poca homogeneidad junto a la presencia de agregados densos de microorganismos pegados a las paredes del conducto, formando delgadas capas. Los espacios entre microorganismos estaban rellenos de un material amorfo que fue interpretado como una matriz extracelular de origen bacteriano. Cuando esto ocurría, las condensaciones bacterianas mostraban una estructura en empalizada similar a la placa dental.

### **BIOFILMS O BIOPELÍCULAS DE *Enterococcus faecalis***

En la actualidad, está bien establecido que el estilo de vida bacteriano más común en los ambientes naturales es aquel en que las bacterias se adhieren a una superficie formando una estructura conocida como biofilm, donde encuentran los medios fundamentales para su desarrollo<sup>43</sup>

De hecho, se considera que las bacterias que no se encuentren formando parte de un biofilm constituyen la fase inicial de formación de otra en una nueva superficie<sup>44</sup>. Por lo tanto, se puede definir a biopelícula o Biofilm como una estructura compleja formada por agregados celulares y huecos intersticiales, adherida a un material o interface que puede ser de naturaleza abiótica o biótica. Los microorganismos que componen el biofilm están unidos por una matriz de polímeros extracelulares (EPS) que son producidos y excretados por ellos mismos.<sup>45</sup>

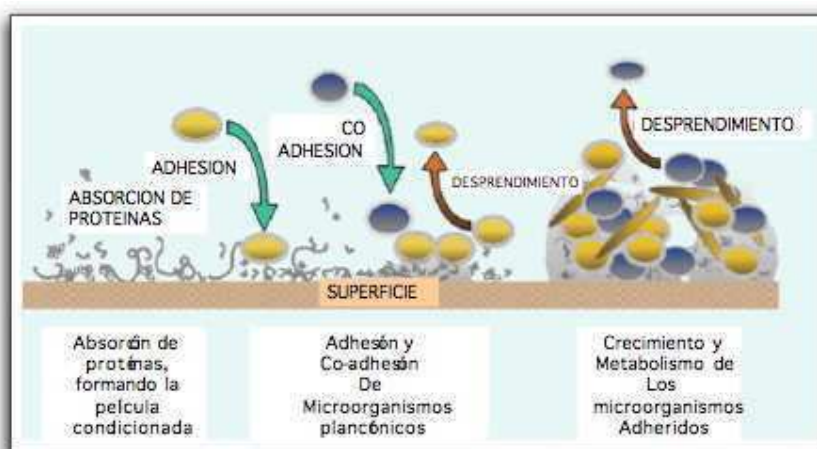


Figura 1 . Formación de Biofilms.

En el biofilm, la comunicación célula a célula es esencial en el desarrollo y mantenimiento de la misma. La adherencia de una bacteria a la superficie es una señal para la expresión de genes específicos del biofilm. Estos genes codifican proteínas que sintetizan moléculas que actúan como señales para la unión célula a célula, y el inicio de formación de polisacáridos. A medida que se van acumulando, estas moléculas actúan

como agentes quimiotácticos e inductores de un mecanismo denominado “percepción del quorum” (quórum sensing) dando lugar al biofilm.

Después del contacto inicial con la superficie, los microorganismos comienzan a producir delgadas fibras que con el tiempo se vuelven más densas hasta que se convierten en una capa de polisacáridos extracelulares. Este puede atraer nutrientes del medio ambiente, que permiten a la bacteria multiplicarse, el proceso de unión consiste en la adsorción, consolidación y colonización (fig.1); otro factor que se debe tener en cuenta son las características de la superficie que también influyen en la adherencia. Esta biocapa bacteriana puede adquirir la capacidad de sobrevivir a los procesos de desinfección ya que como consecuencia de la adherencia el microorganismo se vuelve más resistente. Las bacterias se van volviendo más autóctonas del ambiente. Estos microorganismos pueden coexistir formando conglomerados que les ha permitido aumentar su resistencia frente a los desinfectantes tradicionales <sup>46</sup>

Las funciones que ejercen los Polímeros Extracelulares (EPS) son:

1. Permitir, establecer y mantener asociaciones entre microorganismos y entre estos y su medio ambiente.<sup>47</sup>
2. Constituyen una fuente de reserva de energía y carbono<sup>48</sup>
3. Protegen a las exo-enzimas secretadas por la bacteria que no están en contacto directo con la membrana celular, y cuya función es la de hidrolizar moléculas orgánicas de alto peso molecular.<sup>49</sup>

4. Actúan como protector ya que los exopolisacáridos confieren a la célula bacteriana una protección frente a la desecación, dada la capacidad de estos polímeros de retener agua.<sup>50, 51</sup>
5. Se comportan como una esponja donde quedan atrapadas y concentradas moléculas orgánicas e iones del medio acuoso. Este proceso favorece la concentración de nutrientes bacterianos en el interior del biofilm.<sup>52</sup>
6. Confieren a la célula protección frente a agentes antimicrobianos.

Son más resistentes a los agentes tóxicos en forma del biofilm que en forma individual debido a:

1. El biofilm es una barrera física que impide la difusión de agentes tóxicos. El mecanismo de resistencia es que la matriz crea un impedimento para que el agente antimicrobiano difunda hasta las bacterias.<sup>53</sup>
2. El número de bacterias concentradas en un biofilm es muy superior y ofrece la posibilidad de liberar enzimas en concentraciones mayores a las que podrían ser liberadas en medio libre; estas enzimas serían las responsables de modificar los agentes microbianos y transformarlos a formas no tóxicas.
3. Desde el punto de vista químico, el biofilm posee grupos químicos que por sí solos neutralizan el agente antimicrobiano.
4. El bajo nivel metabólico en un biofilm aumenta la resistencia contra agentes biocidas debido a que la principal función no es multiplicarse, sino asegurar la persistencia del biofilm, lo que supone aunar esfuerzos para contrarrestar aquello que le es tóxico.<sup>54</sup>
5. Los microorganismos que coexisten con un mismo hábitat ponen en marcha la maquinaria genética capaz de neutralizar el agente microbiano, de forma

que incluso se puede llegar a decir que se produce un cambio en le fenotipo del biofilm.<sup>55</sup>

La capacidad de *E. faecalis* para crecer formando biofilms en las paredes del conducto radicular ha sido demostrada in vitro, lo que le confiere mayor resistencia a la terapia endodóntica<sup>56, 57, 58, 59</sup>. De este modo tiene la habilidad de sobrevivir a los procedimientos de desinfección químico – mecánica, resistir a las medicaciones intraconducto y/o adaptarse al ambiente en el cual la disponibilidad de nutrientes es escasa o limitada,<sup>60</sup> pudiendo permanecer remanente en un conducto adecuadamente obturado. No obstante, bajo estas condiciones, los microorganismos residuales que habitan los túbulos dentinarios son frecuentemente confinados a un espacio reducido por los materiales de obturación y están expuestos a condiciones de crecimiento adverso.

Sin embargo, si el conducto radicular está pobremente obturado, o el cemento sellador se disuelve, se formarán intersticios y llegaran nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano, favoreciendo la formación de Biopelículas. En dientes sobre-obturados, el sellador alrededor del foramen apical podría no solidificar y disolverse por el contacto del fluido periapical. Los microorganismos remanentes, entre ellos el *E. faecalis* pueden colonizar el espacio dejado por el sellador y formar biofilms extra-radicales a través de la extrusión de la gutapercha.<sup>61</sup> La filtración bacteriana no solo ocurre por vía apical, sino también por vía coronal como sucede cuando existen defectos en el sellado marginal de las restauraciones, infección periodontal, así como traumatismos.

## **SOLUCIONES IRRIGANTES EN LA TERAPIA ENDODÓNTICA**

### **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS SOLUCIONES IRRIGANTES FRENTA A BIOFILMS DE *E. faecalis***

El modo de crecimiento en Biofilms es una estrategia de supervivencia de los microorganismos ante condiciones ambientales adversas. En lo que a las infecciones endodónticas concierne el concepto de biofilms ha ganado atención en la última década. Actualmente las investigaciones se están realizando sobre actividad antimicrobiana sobre biofilms. La desinfección total no puede alcanzarse con medios químicos solamente, ya que esta se encuentra influenciada por diversos factores como: tipo de bacteria , concentración del desinfectante, tiempo de actuación, temperatura del ambiente , el PH y finalmente la naturaleza de las superficies

#### **CLORHEXIDINA**

El gluconato de clorhexidina fue desarrollado en la década de 1940 en Inglaterra y salió al mercado en 1954 como antiséptico para heridas de piel. Más tarde el antiséptico comenzó a usarse más ampliamente en cirugía y medicina. El uso en odontología se hizo para la desinfección de la cavidad oral, donde a partir de 1970 , gracias a Loe y Schiott, se popularizó como enjuague bucal capaz de inhibir la neo-formación de placa y el desarrollo de la gingivitis.

La clorhexidina es una molécula bi-catiónica que actúa adsorbiéndose a la pared celular del microorganismo, destruye la integridad de la membrana citoplasmática y origina la pérdida de los componentes intracelulares. La

naturaleza dicatiónica de la clorhexidina la hace extremadamente interactiva con los aniones. Es efectiva frente a gran número de bacterias orales, principalmente frente a las grampositivas y en menor medida frente a gram negativas<sup>62</sup>. No es viricida ni esporicida y su actividad frente a los hongos es relativa. Es activa entre PH 5 y 8. Su acción es rápida y duradera debido a la SUSTANTIVIDAD, siendo inferior en presencia de materia orgánica. Es menos tóxica para el tejido periapical que otras soluciones irrigantes empleadas en endodoncia, como el hipoclorito de sodio<sup>63</sup>. Estas propiedades hacen que sea uno de los irrigantes más importantes propuestos en la terapia de conductos radiculares.

### **PROPIEDADES DE LA CLORHEXIDINA**

Aunque es una base, la clorhexidina se mantiene más estable en forma de sal y la preparación más común es la sal de digluconato por su alta solubilidad en agua (Fardal y Tumbull, 1986). Se une fuertemente a la membrana celular bacteriana, lo que a bajas concentraciones produce un aumento de la permeabilidad con filtración de los componentes intracelulares incluido el potasio (efecto bacteriostático), en concentraciones más altas produce la precipitación del citoplasma bacteriano y muerte celular (efecto bactericida).

En la terapia endodóntica, las propiedades que la favorecen son:

1. Baja tensión superficial para poder penetrar los conductos accesorios y túbulos dentinarios<sup>64</sup>
2. Lubricante : ayuda a que los instrumentos se deslicen dentro del conducto.



3. Acción bactericida: efectos antimicrobianos como el hipoclorito de sodio<sup>65</sup> sustancia antibacteriana activa contra un amplio rango de microorganismos; gram positivos y gram negativos , levaduras , hongos, anaerobios facultativos y aeróbicos.
4. Relativamente inocua
5. No tiene olor desagradable
6. No es caústica como el hipoclorito de sodio<sup>66</sup>
7. Actividad residual de varias horas después de la instrumentación
8. Fácil almacenamiento y manipulación
9. Baja toxicidad: Bajo potencial de irradiación a los tejidos. La naturaleza catiónica de la clorhexidina minimiza su absorción a través de la piel y las mucosas, incluidas las vías gastrointestinales. Por lo tanto no se ha descrito toxicidad sistémica por aplicación tópica o ingestión ; ni tampoco hay incidencias de teratogenia en el modelo animal.

Contrariamente a todo esto la clorhexidina presenta un alto costo, no disuelve tejido, mancha o pigmenta la estructura dentaria, sabor amargo, y menos común causa erosión de la mucosa por alteraciones en las células epiteliales superficiales en algunas personas; este efecto colateral depende de la concentración y puede ser controlado con enjuagues de doble dilución.

## MECANISMOS DE ACCION DE LA CLORHEXIDINA

La Clorhexidina actúa en un rango de Gram (+) , Gram (-) , levaduras , hongos, anaerobios facultativos como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Sanguis salivarius* y *Escherichia coli*.<sup>68</sup>

La cantidad de clorhexidina absorbida depende de la concentración utilizada. Su acción es el resultado de la absorción dentro de la pared celular de los microorganismos produciendo filtración de los componentes intracelulares. Produce daño en las barreras de permeabilidad de la pared celular , originando trastornos metabólicos en las bacterias . Se origina una precipitación proteica en el citoplasma bacteriano, inactivando sus procesos reproductivos y vitales.<sup>69, 70</sup> .

A bajas concentraciones de clorhexidina, las sustancias de bajo peso molecular como potasio y fosforo, se filtran y ejercen un efecto bacteriostático. En altas concentraciones, es bactericida, causando precipitación del citoplasma bacteriano y muerte celular.

Debido a propiedades catiónicas de la clorhexidina, este se une a la hidroxiapatita del esmalte dental, la película de la superficie del diente, a las proteínas salivares, a las bacterias y polisacáridos extracelulares de origen bacteriano. La clorhexidina es absorbida y liberada en forma gradual por mas de 24 horas<sup>71, 72, 73</sup> por eso se cree que reduce la colonización bacteriana en la superficie de los dientes.<sup>74</sup>

## **USO DE LA CLORHEXIDINA EN ENDODONCIA**

El uso de la clorhexidina fue aprobado en setiembre de 1986 por la FDA y el Council on Dental Therapeutic of American Dental Association<sup>67</sup>

La clorhexidina se ha propuesto como irrigante de conductos radiculares por su acción bactericida, compatibilidad, su liberación gradual prolongada; así como medicamento intracanal.

Según White y col<sup>75</sup>, la liberación prolongada de la clorhexidina, fue de 48 a 72 horas después de la instrumentación y el uso de Clorhexidina al 2% tiene mejores propiedades antibacterianas que al 0.12 %.

Si la actividad del irrigante fuera solamente antimicrobiana, el irrigante a escoger sería la Clorhexidina, pero esta es insuficiente para disolver tejido, sin embargo en comparación con el NaOCl es menos tóxico. Podría ser utilizado como alternativa en pacientes alérgicos al NaOCl. Por lo tanto es una alternativa como irrigante en Endodoncia.

## **AGENTES SURFACTANTES**

Son especies químicas con una naturaleza o estructura polar - no polar, con tendencia a localizarse en la interfase formando una capa mono-molecular adsorbida en la interfase que cambia el valor de la tensión superficial.

## **TENSIÓN SUPERFICIAL**

Es la fuerza de atracción que tiende a arrastrar a las moléculas de la superficie hacia el interior del líquido y al hacerlo el líquido se comporta como si estuviera rodeado por una membrana invisible.

Esta propiedad es la responsable de la resistencia que un líquido presenta a la penetración de su superficie, de la tendencia a la forma esférica de las gotas de un líquido, del ascenso de los líquidos en los tubos capilares y de la flotación de objetos u organismos en la superficie de los líquidos

Las moléculas del contorno tienen menos partículas vecinas que las interiores y por eso tienen un estado más alto de energía. Para el líquido, el disminuir su estado energético, es minimizar el número de partículas en su superficie. Energéticamente, las moléculas situadas en la superficie tiene una mayor energía promedio que las situadas en el interior, por lo tanto la tendencia del sistema será disminuir la energía total, y ello se logra disminuyendo el número de moléculas situadas en la superficie, de ahí la reducción de área hasta el mínimo posible.

## **TENSOACTIVIDAD**

Es el fenómeno por el cual una sustancia reduce la tensión superficial al disolverse en agua u otra solución acuosa.<sup>76</sup>

Los agentes activos superficiales o surfactantes son moléculas que contienen un segmento liposoluble y otro hidrosoluble que le permiten ocupar la interface entre la fase acuosa y lipídica .

## **CLASIFICACIÓN DE TENSOACTIVOS**

En función de la carga iónica de la superficie de la molécula, los surfactantes se clasifican en aniónicos, la carga molecular es negativa; catiónicos, positiva; no iónicos no hay carga y en los anfóteros existe cargas tanto positivas como negativas.

## PROPIEDADES DE LOS AGENTES TENSOACTIVOS:

Los agentes tensoactivos presentan todas estas propiedades en algún grado: agentes mojadores o humectantes, dispersantes, defloculantes, detergentes, emulsificadores, suspensores y solubilizantes; pero, en general, domina una de ellas sobre las demás, lo cual hace que se restrinja el empleo de cada agente a una aplicación determinada.

### AGENTES HUMECTANTES O MOJADORES

Un *agente humectante* es un tensoactivo que, cuando se disuelve en el agua, hace disminuir el ángulo de contacto y ayuda a desplazar la fase aérea de la superficie, reemplazándola por otra líquida.

La acción más importante de un agente humectante es la de disminuir el *ángulo de contacto* entre el líquido y la superficie en que se apoya, entendiendo por ángulo de contacto el ángulo que existe entre la superficie de una gotita líquida y la superficie sobre la cual se encuentran. El ángulo de contacto entre un líquido y un sólido puede variar desde  $0^\circ$ , señal de que el líquido moja completamente al sólido, hasta aproximarse a  $180^\circ$ , cuando la acción mojanter es insignificante; pudiendo también presentar cualquier valor intermedio entre estos límites. (fig. 2)

Para que un agente humectante actúe con eficacia, debe presentar un ángulo de contacto pequeño.

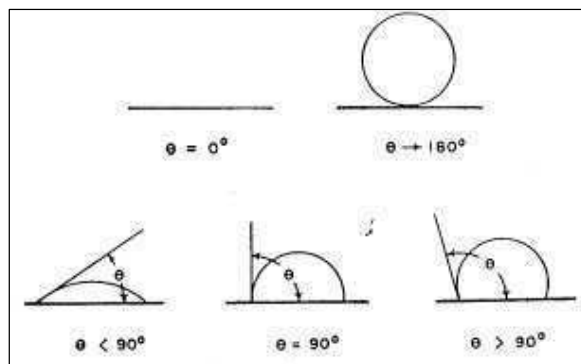


Fig 2. Ángulos de contacto

## **ADSORCIÓN DE SURFACTANTES EN LA INTERFASE SÓLIDO-LÍQUIDO**

La adsorción de los surfactantes iónicos en la interfase sólido-líquido juega un importante rol en el ámbito comercial y tecnológico.

La adsorción de los surfactantes en la interfase sólido-líquido está fuertemente influenciada por numerosos factores:

- (a) La estructura de los grupos en la superficie sólida, que comprende: la densidad de los sitios de adsorción, de las heterogeneidades superficiales y la carga eléctrica de las superficies.
- (b) La estructura molecular del surfactante (iónica, no-iónica, naturaleza del grupo hidrófilo, longitud de la cadena alifática o aromática) y
- (c) Las características de la fase acuosa (pH, temperatura, presencia de electrolitos, etc.). Todos estos factores determinan el mecanismo por el cual ocurre la adsorción y la eficiencia de la misma [7].

## **MECANISMOS DE ADSORCIÓN DE UN SURFACTANTE**

**a) Intercambio iónico:** consiste en el reemplazo de iones adsorbidos en el sustrato por otros iones. Es el caso, por ejemplo, de la adsorción de amonios cuaternarios en sustitución de iones hidrógeno en el proceso de protección contra la corrosión.

**b) Puente de hidrógeno:** es el proceso de enlace polar entre el hidrógeno de una molécula y un átomo cargado negativamente (O, S) en la superficie, o viceversa.

**c) Emparejamiento iónico:** Es la adsorción de iones (surfactantes) en sitios cargados no ocupados, un ejemplo es la adsorción de surfactantes catiónicos o anfóteros sobre sitios cargados negativamente.

**d) Adsorción por fuerzas de London - Van der Waals:** estas fuerzas son producidas entre sustratos y moléculas no polares, y son las fuerzas de cohesión de los líquidos orgánicos, a menudo llamadas fuerzas de dispersión, porque la frecuencia de oscilación de los electrones, que es la responsable de estas fuerzas; está ligada al índice de refracción del medio.

**e) Adsorción por rechazo hidrofóbico:** es cuando el empaquetamiento de las moléculas de surfactante a la interfase asegura un enlace lateral entre la cola lipofílica de una molécula y las moléculas vecinas, permitiendo a las moléculas escapar al ambiente acuoso.

**f) Adsorción por polarización de electrones  $\Pi$ :** ocurre cuando se produce una atracción entre un núcleo aromático y sitio positivo en la superficie del sustrato. [8]  
La interacción recíproca entre adsorbato y adsorbente depende de la naturaleza de fuerzas, las cuales pueden ser de origen químico, quimisorción (enlaces covalentes o electrovalentes); o fuerzas físicas (enlaces del tipo Van der Waals) en este caso se trata de adsorción física o de adsorción de naturaleza electrostática. Esta última controlada por el pH de la solución junto con la adsorción de los iones inorgánicos.

## **ACCIÓN ANTIBACTERIANA DE LOS AGENTES TENSOACTIVOS**

Muchos de los agentes superficialmente activos actúan en la superficie de las células y bacterias, reduciendo la tensión superficial e interfacial a consecuencia de su adsorción y extensión.

La actividad antibacteriana de los agentes tensoactivos, en particular la de los compuestos cuaternarios, es bien conocida, depende no sólo de los fenómenos

interfaciales, sino también de otros importantes factores. Estos agentes son adsorbidos sobre la superficie celular, y es de suponer que se produzca la destrucción de las células al aumentar la permeabilidad de la membrana celular lipoidea. Por tanto, la muerte de los microorganismos es debida a la pérdida de sustancias esenciales para la vida celular. Tanto los microbios Gram positivos como los Gram negativos son sensibles a la acción de los compuestos cuaternarios catiónicos; sin embargo, las bacterias Gram positivas son atacadas con más facilidad por los agentes aniónicos que las Gram negativas. Los tensoactivos no iónicos son los agentes antibacterianos menos eficaces, ya que, en realidad, éstos favorecen, en lugar de inhibir, el crecimiento de las bacterias, posiblemente por proporcionar los ácidos grasos de cadena larga en una forma tal que son metabolizados con facilidad por el microorganismo.

### **SURFACTANTES O TENSOACTIVOS CATIONICOS**

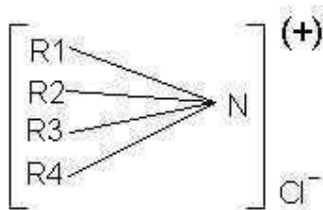
El término "surfactante catiónico" se refiere a los compuestos que contienen por lo menos una cadena de 8 a 25 átomos de carbono, derivada de un ácido graso o de un derivado petroquímico y un nitrógeno cargado positivamente, el anión suele ser un Cl (-) Br(-) OH (-) , SO<sub>4</sub> (-2).

La cadena larga constituye el grupo hidrofóbico, en tanto que el hidrofílico pequeño y altamente ionizado, lo constituye el nitrógeno tetravalente en forma de sales de amonio cuaternario. Estos surfactantes son de menor interés que los agentes aniónicos y no-iónicos pero reside su importancia en su eficiencia bactericida, germicida, algicida etc.





Fórmula:



Los surfactantes catiónicos representan, en cuanto a su consumo, aproximadamente el 5% del total, es decir menos que los surfactantes aniónicos y no-iónicos.

En general no son buenos detergentes, y tampoco buenos espumantes, sin embargo tienen *dos propiedades importantes y casi únicas*; primero se adsorben sobre sustratos cargados negativamente, y segundo muchos de ellos tienen **Propiedades Bactericidas**. Esto los convierte en ingredientes esenciales en productos de limpieza y en cualquier aplicación donde se requiera que el surfactante tenga afinidad por superficies sólidas. [6]

## **SURFACTANTES CATIONICOS EN ENDODONCIA**

Los surfactantes catiónicos en endodoncia destacan por dos propiedades importantes. Por un lado se absorbe sobre sustratos cargados negativamente produciendo una capa hidrófoba que aumenta el ángulo de contacto con el agua, reduciendo de este modo la tensión superficial de los líquidos. Por otro lado los surfactantes catiónicos del tipo amonio cuaternario tienen acción antiséptica y bactericida<sup>77</sup>. Actúan sobre las membranas

bacterianas reaccionando con los componentes fosfolipídicos provocando distorsión de la membrana citoplasmática y lisis por estrés osmótico<sup>78</sup>

Además la carga positiva de estos surfactantes genera un efecto biocida sobre las células microbianas<sup>79</sup> ya que cambia el signo de la superficie celular de negativo a positivo y estas mueren.<sup>80</sup> En el caso de las biofilms, este cambio electrostático desestabiliza las fuerzas cohesivas que mantienen la integridad de la estructura, originando la eliminación de la misma. No son tóxicos en las concentraciones utilizadas.<sup>9</sup>

### **AMONIO CUATERNARIO**

Los compuestos de amonio cuaternario conocidos como Quats, cuaternarios o QACs son esencialmente sales de amonio con algunos o con todos los átomos del ion amonio  $(\text{NH}_4)^+$  sustituidos por grupos alquilo o arilo, el anión es generalmente un grupo bromuro o cloruro. Ejemplos de estos desinfectantes más comúnmente usados son el bromuro de cetil-trimetil amonio y lauril dimetil bencil amonio.

Los QACs son bactericidas muy activos frente a las bacterias gram positivas, siendo menos eficaces para las gram negativas, salvo que se les haya añadido secuestrantes; las esporas bacterianas son relativamente resistentes, si bien previenen su desarrollo.

Las superficies desinfectadas con QACs presentan una película bacteriostática debida a la absorción del desinfectante en la superficie. Esta película evita el crecimiento subsiguiente de las bacterias residuales. Los QACS mantienen su actividad en un rango de PH de 5-10; por encima de 10 o debajo de 4, disminuyen notablemente su eficacia. Comparados con hipocloritos, los QAC son más caros pero tienen muy buenas propiedades,

son poco afectados por la presencia de restos orgánicos, no son corrosivos, si bien atacan a ciertos tipos de gomas y no son irritantes de la piel, salvo a grandes concentraciones, por ello se pueden manipular con bastante seguridad.

Al ser surfactantes catiónicos poseen cierto poder detergente. El agua dura disminuye su actividad con una potencia que depende de la longitud de la cadena alquílica del QAC.

Los QACS son sustancias que lesionan la membrana celular debido a que se unen irreversiblemente a los fosfolípidos y proteínas de la membrana, deteriorando la impermeabilidad.

## **CETRIMIDA**

El bromuro de cetil-trimetil amonio o cetrimida es un surfactante catiónico derivado del amonio cuaternario cuya actividad bactericida se ha demostrado frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, así como antifungicas<sup>10</sup>.

### **Propiedades Físico Químicas**

Se encuentra en forma natural como polvo cristalino y blanco.

Bromuro de hexadeciltrimetilamonio	
<a href="#">Nombre químico</a>	Bromuro de N,N,N-trimetil,1-Hexadecan-amino
Otros nombres	Bromuro de N,N,N-trimetilhexadecanamonio CTAB Bromuro de hexadeciltrimetilamonio Bromuro de cetiltrimetilamonio
<a href="#">Fórmula química</a>	C <sub>19</sub> H <sub>42</sub> BrN
<a href="#">Masa molecular</a>	364.48 g/mol
<a href="#">Temperatura de fusión</a>	237-243 °C
<a href="#">formula química</a>	CCCCCCCCCCCCCCCC[N](C)(C)C.[Br-]

Como cualquier otro surfactante forma micelas en solución acuosa. A 303 K (30 °C) forma micelas con un número de agregación de 75-120 (según el método de determinación, normalmente con una media de ~95) y un grado de ionización  $\alpha$  (carga fraccional) de 0,2 - 0,1 (de baja a alta concentración).

Otros compuestos relacionados químicamente son cloruro de cetil trimetil amonio y el estearato de cetil trimetil amonio.

### Propiedades Bioquímicas

El Bromuro de hexadecil trimetil amonio o Bromuro de cetil trimetil amonio ((C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>)N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Br) es una sal de amonio cuaternario, uno de cuyos

grupos alquilo es de gran longitud, con actividad detergente. Se le conoce también por las siglas CTAB, del inglés Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide.

El CTAB es un detergente catiónico que tiene la propiedad de precipitar ácidos nucleicos y polisacáridos ácidos en soluciones de baja concentración iónica. Bajo estas condiciones las proteínas y los polisacáridos neutros permanecen en solución. En soluciones de alta concentración iónica el CTAB forma complejos con las proteínas y polisacáridos pero no precipita ácidos nucleicos. Por esta razón es especialmente útil para precipitar ADN genómico de organismos que producen grandes cantidades de polisacáridos como las plantas y algunas bacterias Gram negativas (incluyendo algunas cepas de *E. coli*).

### **MECANISMO DE ACCIÓN EN EL SISTEMA DE CONDUCTOS RADICULARES**

Cetrimida al comportarse como agente humectante, se disuelve en el agua, haciendo disminuir el ángulo de contacto entre el líquido y la superficie en que se apoya; ayudando a desplazar la fase aérea de la superficie, reemplazándola por otra líquida (otro irrigante en este caso); potenciando el efecto del irrigante principal.

La actividad antibacteriana de los compuestos cuaternarios depende no sólo de los fenómenos interfaciales, sino también de otros importantes factores. Estos agentes son adsorbidos sobre la superficie celular, y es de suponer que se produzca la destrucción de las células al aumentar la permeabilidad de la membrana celular lipoidea. Por tanto, la muerte de los microorganismos es debida a la pérdida de sustancias esenciales para la vida celular. Tanto los microbios

Gram positivos como los Gram negativos son sensibles a la acción de los compuestos cuaternarios catiónicos

### **Usos y Aplicaciones**

Es un antiséptico tópico . El catión cetil trimetil amonio es un agente antiséptico efectivo contra bacterias y hongos; ya que tiene propiedades de interrumpir de los procesos celulares de los microorganismos. Se usan, además, como antiséptico tópico.

Sus usos incluyen la utilización como solución tamponante para la extracción de ADN y se pueden encontrar en diversos productos de uso doméstico como champús y cosméticos.

#### **OTROS USOS:**

- Agente algicida
- Ingrediente activo para suavizantes
- Agente antiestático
- Suavizante para textiles y papeles
- Catalizador de transferencia de fase
- Agente emulsificante
- Dispersante de pigmentos

**Ventajas**

Tiene la ventaja de ser muy poco irritante y reduce la tensión superficial de los líquidos , favoreciendo la entrada de estos a lugares de difícil acceso a lugares como los túbulos dentinarios<sup>3</sup>. Estas características justifican su inclusión como componente de soluciones irrigadoras usadas en endodoncia como Cetrexidin®, SmearClear®, REDTA® y EDTAC®, entre otras. Cuando se combina con clorhexidina se ha demostrado que existe sinergismo ya que ambos actúan en la pared celular de las bacterias.<sup>81</sup>



### 3.3 DEFINICION DE TÉRMINOS BÁSICOS

1. **Adsorción:** Es un proceso por el cual átomos, iones o moléculas son atrapadas en la superficie de un material, en contraposición a la absorción, que es un fenómeno de volumen.
2. **EPS:** La matriz de exo-polisacáridos son hidratos de carbono complejos que se excretan y acumulan por fuera de las células y dan al cultivo un aspecto mucoso.
3. **Biofilm:** Comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exo-polisacáridos y adheridos a una superficie inerte o a un tejido vivo.
4. **Efectividad:** Que produce gran efecto en la erradicación de los biofilms de *Enterococcus faecalis*
5. **Tension Superficial:** Capacidad de un líquido para penetrar en un tubo capilar

### 3.4 HIPÓTESIS

La efectividad de la asociación de Cetrimida- Clorhexidina 15%/ 0.15% es mayor que Clorhexidina 2% en la erradicación de Biofilms de *Enterococcus faecalis* in vitro.

### 3.5 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	CONCEPTUALIZACION	INDICADOR	ESCALA	CATEGORIA
<u>Variable Independiente:</u>  EFECTIVIDAD de la irrigación	Con asociación Cetrimida - Clorhexidina 15%/ 0.15% en biofilms de E. faecalis	% Inhibición Bacteriana, por comparación de UFC/mL antes y después de la exposición a los irrigantes	<u>Nominal</u>	Efectivo >=99 %  No efectivo <99%
	Con Clorhexidina 2% en Biofilms de E. faecalis			
<u>Variable Dependiente:</u>  Erradicación de Biofilms de Enterococcus <i>faecalis</i>	Microorganismo asociado a enfermedad endodóntica persistente que desarrolla en forma de biofilms	Variación de UFC en cepas de Enterococcus faecalis ATCC	<u>NOMINAL</u>	Presencia >0 UFC  Ausencia =0 UFC

## IV. METODOLOGÍA

### 4.1 TIPO DE ESTUDIO

El tipo de investigación es:

- **EXPERIMENTAL:** Ya que se manipularan y se reproducen artificialmente las variables, dividiéndose en grupo control y experimental.
- **PROSPECTIVO:** Porque está orientada a obtener información en el tiempo a partir de la aplicación del estímulo.
- **COMPARATIVO:** Porque se establecen semejanzas y diferencias a través de los resultados.
- **IN VITRO** : Porque se lleva a cabo bajo condiciones similares a las reales.

### 4.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

#### UNIDAD DE ANÁLISIS

Unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa pura de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

#### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Biofilms formadas a partir de cepa pura de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **RECURSOS HUMANOS**

Un operador entrenado mediante pruebas piloto para realizar la toma de muestra, procedimientos y evaluación microbiológica de acuerdo a los parámetros establecidos en la presente investigación; además se cuenta con asesoramiento profesional y apoyo de personal técnico calificado. La ejecución del presente trabajo estuvo bajo monitoreo, asesoramiento y constante supervisión de la asesora de tesis.

### **RECURSOS MATERIALES**

- Cepas ATCC de *Enterococcus faecalis*
- SAFE BLON (1L)
- Clorhexidina 2% (1L)
- Agua Destilada Estéril (2L)
- Suero Fisiológico Estéril (1L)
- Agar Trypticase Soya
- Agar MRS
- Agar Nutritivo
- Caldo Cerebro Corazón (BHI)

- Ficha de evaluación, registro de datos y artículos de oficina (lapiceros, plumón indeleble, marcador, etiquetas adhesivas).

**Equipos Materiales e Instrumental para Procedimientos de las Muestras en el Laboratorio de Microbiología de BIOSERVICE SRL:**

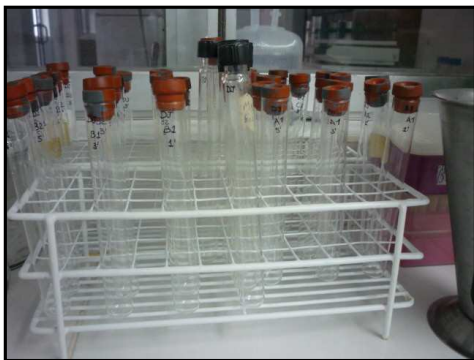
**(Figura 3)**

- Autoclave
- Incubadora
- 40 Frascos plásticos estériles de 50 mL.
- 80 Tubos de ensayo estéril
- 150 Placas Petri estériles
- Mechero
- Encendedor
- Asa de siembra
- Pala de Siembra
- Porta asa de siembra
- Gradillas
- 40 Hisopos estériles
- 27 Láminas Portaobjetos estériles
- Agitador de Balanceo

- Balanza eléctrica de precisión
- Probeta graduada (500 mL)
- 6 Botellas de vidrio estériles con tapa hermética (500 mL)
- Cámara de Flujo Laminar
- Jarra Gaspac para Anaerobiosis
- Refrigerador
- Estufa
- Pipetas graduadas
- Tips para 10 microlitros
- Tips para 100 microlitros
- Tips para 5 mililitros
- Envase para Tips
- Envase para desechos líquidos
- 4 Pinzas rectas estériles
- Reloj cronómetro con alarma

Figura 3. Materiales de Laboratorio que fueron empleados en la investigación.

A. Tubos de ensayo rotulados. B. Pipetas. C. Placas Petri, gradillas, con los tubos de ensayo estériles.



3.A



3.B



3.C

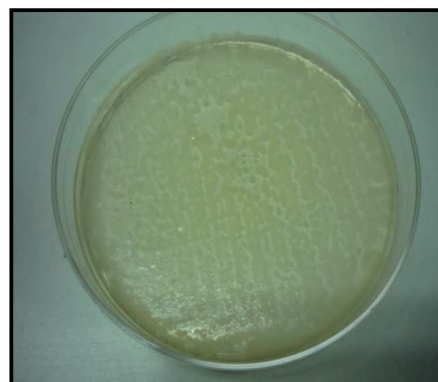
### INFRAESTRUCTURA:

- Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio BIOSERVICE SRL (Av. Nicolás de Piérola 1228, Villa María del Triunfo)

### 4.3 PROCEDIMIENTOS Y TECNICAS

#### 1. Muestra

Cepa pura de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. (Fig. 4)



## **2. Preparación de los Medios de Cultivo: (fig. 5)**

### **4.2. Agar Tripticasa Soya**

Preparación: Adicionar por cada 1000 mL de agua destilada, 40 g de Agar Tripticasa Soya, colocar en el vibrador para su mezcla homogénea por espacio de 5 minutos, someter dicha mezcla al autoclave durante 60 minutos, presión de 2 atm y temperatura 180 °C, Se deja entibiar por aproximadamente 1.5 horas y luego se procede al plaqueado de 15 ml por cada placa petri estéril, se deja en la incubadora por 24 horas para el control de calidad.

Se elaboraron en total 108 placas de Agar Tripticasa Soya

### **4.3. Caldo Infusión Cerebro - Corazón (BHI):**

Preparación: Adicionar por cada 1000 mL de agua destilada, 37 g de Caldo Cerebro Corazón, colocar en el vibrador para su mezcla homogénea por espacio de 5 minutos, someter dicha mezcla al autoclave durante 60 minutos, presión de 2 atm y temperatura 180 °C, Se deja entibiar por aproximadamente 1.5 horas y luego se procede al plaqueado de 15 ml por cada tubo de ensayo estéril, se deja en la incubadora por 24 horas para el control de calidad. Se elaboraron en total 72 Tubos de Ensayo con BHI



#### 4.4. Agar Nutritivo:

Preparación: Adicionar por cada 1000 mL de agua destilada, 23 g de Agar Nutritivo, colocar en el vibrador para su mezcla homogénea por espacio de 5 minutos, someter dicha mezcla al autoclave durante 60 minutos, presión de 2 atm y temperatura 180 °C, Se deja entibiar por aproximadamente 1.5 horas y luego se procede al plaqueado de 15 ml por cada placa petri estéril, Se deja en la incubadora por 24 horas para el control de calidad.

#### 4.5. Agar MRS:

Preparación: Adicionar por cada 1000 mL de agua destilada, 64 g de Agar Nutritivo, colocar en el vibrador para su mezcla homogénea por espacio de 5 minutos, someter dicha mezcla al autoclave durante 60 minutos, presión de 2 atm y temperatura 180 °C, Se deja entibiar por aproximadamente 1.5 horas y luego se procede al plaqueado de 15 ml por cada placa petri estéril, Se deja en la incubadora por 24 horas para el control de calidad.

**Figura 5 .** Preparación de los medios de cultivo a utilizar durante el estudio. A. Balanza eléctrica, B. Determinación de la masa del medio de cultivo deshidratado. C y D. Vaciado del medio de cultivo deshidratado en frasco hermético conteniendo agua destilada (1L). D. Homogenización de la mezcla del medio y solvente (agua destilada) con el Agitador de Balanceo. E. Esterilización del medio en autoclave.



A



B



C



D



E



F

### 3. Preparación del Inóculo

La bacteria a estudiar se obtuvo de la cepa pura de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. (fig. 4 ).

Se realizó el subcultivo para verificar cultivo puro en Agar MRS y Agar Nutritivo a condiciones de anaerobiosis y aerobiosis, respectivamente durante 48 horas a 37 °C. Se observó que no hubo diferencias de crecimiento en cuanto a los medios y las condiciones de incubación.

El medio de cultivo líquido inicial fue Caldo Infusión Cerebro Corazón (80 mL de BHI). Se tomaron dobles ansadas de cada placa petri con Agares: Nutritivo y MRS.

La cepa fue incubada bajo las condiciones: temperatura de 37 °C durante 24 horas. La turbidez del medio mostró crecimiento bacteriano. (Fig 6)

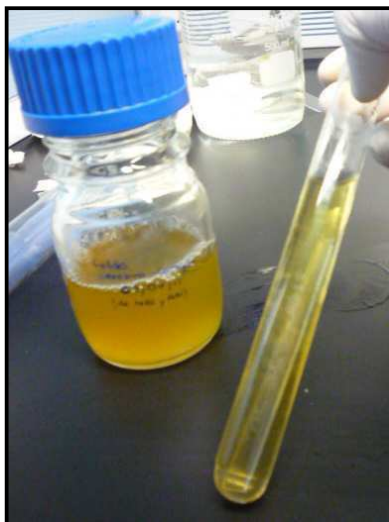


Fig 6

La suspensión resultante fue cuantificada por el método de diluciones seriadas (Fig. 7), Se realizaron 10 diluciones (Fig. 8) debido a la densidad del medio . Fueron plaqueadas las diluciones ( $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  y  $10^{-10}$ ) en Agar Tripticasa Soya e incubadas a condiciones aerobias, a 37 °C y por 48 horas; obteniéndose la densidad final del inóculo bacteriano de  $1,28 \times 10^8$  (UFC)/mL (Fig. 14). Las Alícuotas de esta suspensión fueron utilizadas para la formación de biofilms. (Fig. 12 y 15)

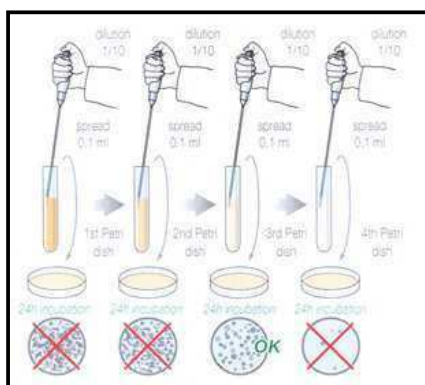


FIG. 7



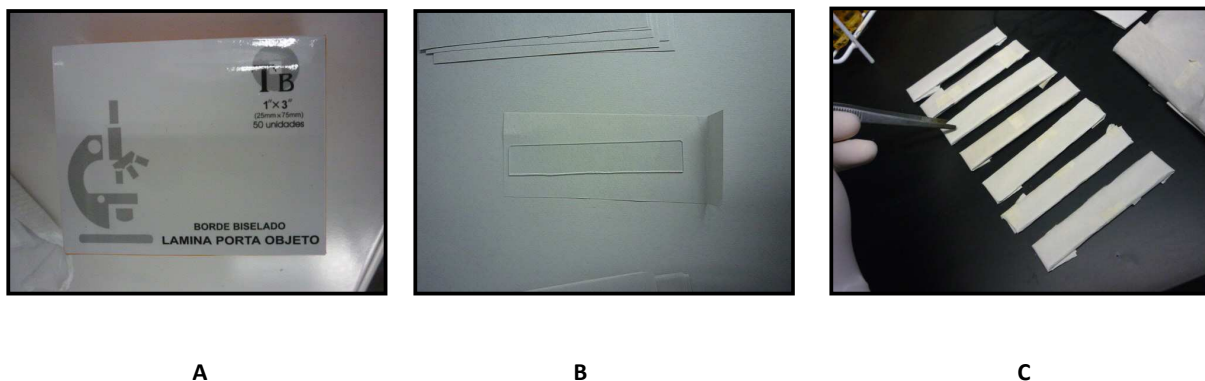
FIG. 8

#### 4. Formación del sistema de Biofilms

El modelo del sistema de biofilms consistió en 14 láminas porta-objeto de vidrio que fueron cortadas por la mitad longitudinalmente (7.5 cm x 1.25 cm), obteniéndose 28 láminas de cristal, las mismas fueron empaquetadas individualmente (Fig. 9), esterilizadas en autoclave durante 1 hora y posteriormente sumergidas en 15 mL de Caldo Cerebro Corazón (BHI) contenidos en 27 tubos de ensayo estériles.

Figura 9 .- Preparación de las láminas lisas de vidrio para el sistema de biofilms.

A. Caja de Láminas portaobjetos. B. Lamina porta-objeto cortada a la mitad longitudinalmente. C. Láminas portaobjetos envueltas individualmente y listas para la esterilización en autoclave.



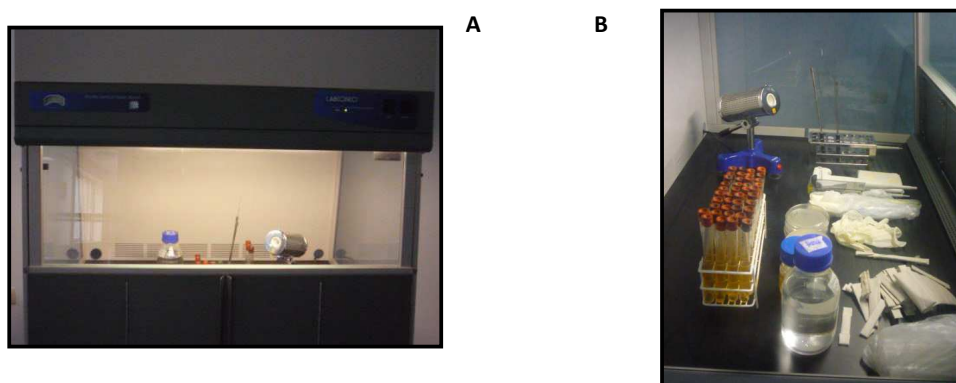
## 5. Inoculación de las Biofilms

Las experiencias se realizaron en una cámara de flujo laminar para evitar la contaminación durante el procedimiento. (Fig. 10 )

Cada tubo con BHI y la lámina porta objeto de cristal fueron inoculados con alícuotas de 0.1 mL de suspensión preparadas en el apartado 3.(Figs. 6 y 12 )

Los tubos luego fueron incubados bajo condiciones aeróbicas, a temperatura de 37°C, durante 48 horas. Esto permitió el desarrollo amplio del biofilm de *Enterococcus faecalis* en las láminas porta objeto.

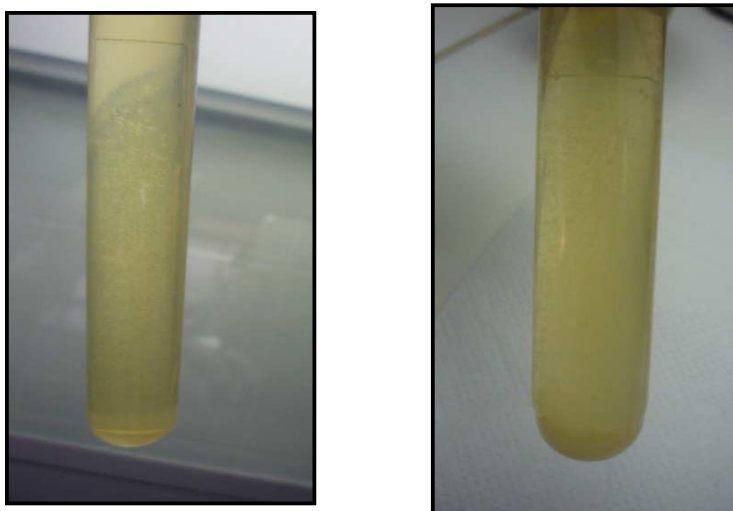
(Fig 10) Cámara de flujo laminar con incinerador. A. por fuera. B. Por dentro.



## 5. Obtención de los Biofilms y Exposición a los Irrigantes

Las láminas fueron extraídas de los tubos de ensayo, observándose la formación de biofilms en las superficies de los portas de cristal (Fig 11).

Fig. 11 Obtención de los biofilms. Se observa la turbidez de láminas porta-objeto internas en cada tubo de ensayo.



Posteriormente fueron sumergidas en agua destilada estéril (así se eliminó las bacterias débilmente adheridas a la superficie del biofilm.)

Luego cada lámina fue expuesta independientemente en vasos de plástico estéril (Fig. 16), conteniendo los siguientes irrigantes:

Grupo A: 100 mL Ceftriaxona-Clorhexidina 15%/0.15 % (SAFEVLON) (fig. 17B)

Grupo B: 100 mL Clorhexidina 2%(fig. 17A )

Grupo Control Negativo: 100 mL Suero Fisiológico (NaCl 9‰)

Se realizó un movimiento lento y continuo mediante hisopos estériles invertidos mientras los biofilms fueron expuestas a diferentes tiempos: 1, 3 y 5 minutos.

Se realizaron tres experimentos independientes y cada grupo ( A, B y control) fueron ensayados por triplicado; llegando a un total de 27 exposiciones de las láminas portaobjetos con biofilms a los irrigantes evaluados (Fig. 18).

#### **6. Cambio de Suspensión e Incubación Final:**

Luego de la exposición a los irrigantes; las láminas fueron sumergidas en 1 mL de solución salina 9‰ y frotadas vigorosamente con hisopos estériles para desprender todo el biofilm de la superficie de la lámina porta objeto. Para el conteo final del número de bacterias viables en los biofilms, se tomó una alícuota de 100 microlitros de la suspensión diluida homogéneamente y se extendió con el asa de siembra sobre la superficie de la placa petri con Agar Tripticasa Soya (TSA). La incubación fue por 24 horas, a 37 °C en condiciones de aerobiosis.

**7. Procesamiento de Datos:** Los datos de UFC encontrados en las placas petri respectivas fueron depositados en la Ficha de recolección de datos. A partir de ello se creó una base de datos en la computadora, en el paquete estadístico SPSS15 para la obtención de los cuadros y gráficas.

#### **8. Lectura y Análisis de Resultados:**

La lectura final de la efectividad de las soluciones irrigantes se realizó mediante el conteo de las UFC/mL (Fig. 19) recolectándose en la Ficha preparada para este fin (ver anexos).

Para determinar el porcentaje de inhibición bacteriana se utilizó la siguiente fórmula:

$$[1-(\text{UFC irrigante}/\text{UFC \# inicial de bacterias})] \times 100.$$

## RESULTADOS

La asociación Cetrimida-Clorhexidina (15% / 0.15%) mostró actividad bactericida, post-incubación dentro de los tiempos evaluados; aunque Cetrimida-Clorhexidina (15%/0.15%) erradicó en 99.99% los biofilms de *Enterococcus faecalis* a cualquiera de los 3 tiempos evaluados (1, 3 y 5 minutos); a excepción de una réplica de 5 minutos en la cual se logró 100% de erradicación de los biofilms (Cuadro 1). Observando la cantidad de UFC/mL viables luego de cada tiempo evaluado, se observa que existe una relación directa en cuanto al tiempo de exposición y efectividad del irrigante en la erradicación de *Enterococcus faecalis*, ya que a medida que aumentaba el tiempo de exposición la cantidad de UFC/ mL viables disminuía. Sin embargo, no se puede establecer como diferencia significativa debido a que la diferencia de cuantificación entre las UFC es mínima y todas conducen a un 99,99% de efectividad (Cuadros 4, 5 y 6).

En relación a Clorhexidina 2% (Cuadro 2); este irrigante erradicó al 100% los biofilms de *Enterococcus faecalis*, en los tres tiempos experimentados demostrando gran efectividad como lo señala Oncag (13); no se puede establecer que exista diferencia significativa entre a la asociación Cetrimida-Clorhexidina 15%/0.15% y Clorhexidina 2%, debido al escaso margen diferencial obtenido entre ambos resultados (Cuadro 7).

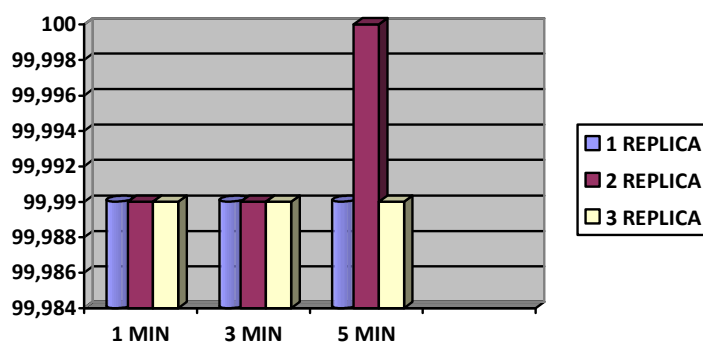
Por otro lado, el control negativo (Suero Fisiológico) (Cuadro 3) mostró actividad bactericida frente a biofilms de *Enterococcus faecalis* con un bajo rango de efectividad fluctuante entre 24 y 31% durante los tiempos evaluados. Mostrando una diferencia significativa con las dos soluciones irrigantes en estudio (Cuadro 7).



**Cuadro nº 1:** RESULTADOS OBTENIDOS DE LA EVALUACION DE CETRIMIDA 15% / CLORHEXIDINA 0.15% FRENTE A BIOFILMS DE ENTEROCOCCUS FAECALIS

RECuento INICIAL:  $1,28 \times 10^8$  UFC/mL

CETRIMIDA 15% / CLORHEXIDINA 0.15%						
REPLICAS	UFC/mL 1 min	% Inhibición 1 min	UFC/ml 3 min	% Inhibición 3 min	UFC/ml 5 min	% Inhibición 5 min
1	1260	99.99%	400	99.99%	10	99.99%
2	820	99.99%	310	99.99%	0	100%
3	690	99.99%	180	99.99%	30	99.99%

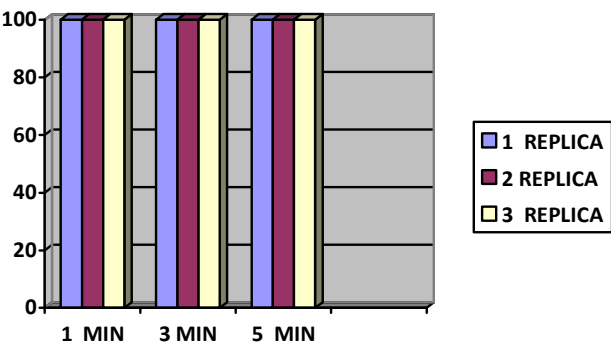


**Gráfico 1 :** SE OBSERVA QUE EN TODOS LOS TIEMPOS EVALUADOS, 1 , 3 Y 5 MINUTOS, EL PORCENTAJE DE INHIBICION BACTERIANA FUE DEL 99,99%; EXCEPTUANDO UN UNICO RESULTADO DONDE SE LLEGÓ AL 100% DE EFECTIVIDAD.

**Cuadro nº 2:** RESULTADOS OBTENIDOS DE LA EVALUACION DE CLORHEXIDINA 2% FRENTE A BIOFILMS DE ENTEROCOCCUS FAECALIS

RECuento INICIAL: 1,28x10<sup>8</sup> UFC/mL

CLORHEXIDINA 2%						
REPLICAS	UFC/mL	%	UFC/ml	%	UFC/ml	%
	1 min	Inhibición	3 min	Inhibición	5 min	Inhibición
		1 min		3 min		5 min
1	0	100%	0	100%	0	100%
2	0	100%	0	100%	0	100%
3	0	100%	0	100%	0	100%



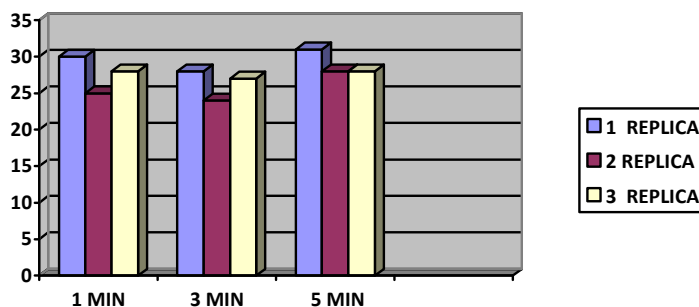
**Gráfico 2:** SE OBSERVA QUE EN TODOS LOS TIEMPOS EVALUADOS, 1, 3 Y 5 MINUTOS, PARA CLORHEXIDINA 2% EL PORCENTAJE DE INHIBICION BACTERIANA FUE DEL 100% .

**Cuadro 3:** RESULTADOS OBTENIDOS DE LA EVALUACION DEL CONTROL NEGATIVO (SUERO FISIOLÓGICO)  
FRENTE A BIOFILMS DE ENTEROCOCCUS FAECALIS

RECuento INICIAL:  $1,28 \times 10^8$  UFC/mL

SUERO FISIOLÓGICO						
REPLICAS	UFC/mL	%	UFC/ml	%	UFC/ml	%
	1 min	Inhibición	3 min	Inhibición	5 min	Inhibición
		1 min		3 min		5 min
1	$89.60 \times 10^6$	30%	$92.16 \times 10^6$	28%	$88.32 \times 10^6$	31%
2	$96.00 \times 10^6$	25%	$97.28 \times 10^6$	24%	$92.16 \times 10^6$	28%
3	$92.16 \times 10^6$	28%	$93.44 \times 10^6$	27%	$92.16 \times 10^6$	28%

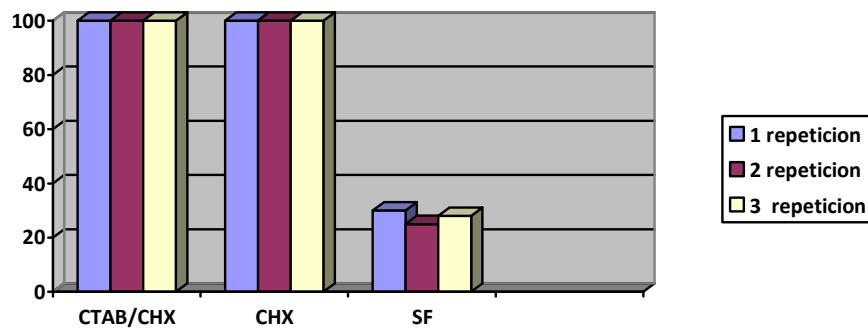
**GRÁFICO 3:** SE OBSERVA QUE DURANTE LOS TIEMPOS EVALUADOS PARA EL CONTROL NEGATIVO (SUERO FISIOLÓGICO), SE EVIDENCIO DURANTE EL PRIMER MINUTO PORCENTAJES DE INHIBICION BACTERIANA QUE FLUCTUARON ENTRE 25 Y 30 %, DURANTE LOS 3 MINUTOS, FLUCTÚARON ENTRE 24 Y 28 % Y PARA LOS 5 MINUTOS ENTRE 28 Y 31 %,



**Cuadro 4.** INHIBICION BACTERIANA **AL MINUTO** DE EXPOSICION A LOS IRRIGANTES EVALUADOS

	UFC/mL Post Irrigación	% Erradicación
CLORHEXIDINA	0	100
	0	100
	0	100
CETRIMIDA / CLORHEXIDINA	1260	99.99
	820	99.99
	690	99.99
CONTROL NEGATIVO (SUERO FISIOLÓGICO)	$89.60 \times 10^6$	30
	$96.00 \times 10^6$	25
	$92.16 \times 10^6$	28

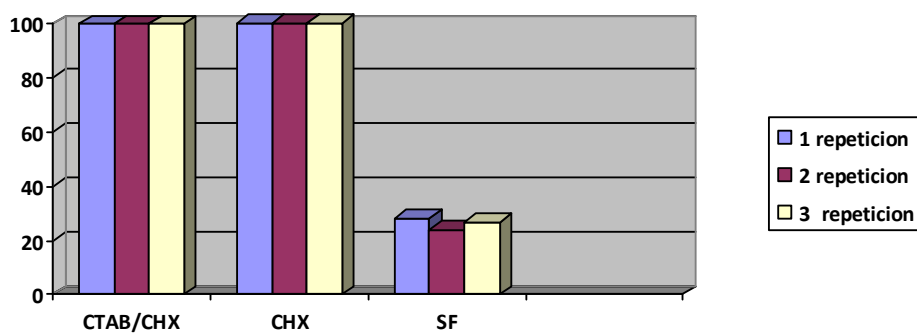
**GRÁFICO 4:** SE OBSERVA QUE AL MINUTO ; CLORHEXIDINA 2% Y CETRIMIDA / CLORHEXIDINA 15%/0.15% ERRADICARON LOS BIOFILMS DE ENTEROCOCCUS FAECALIS EN TODAS LAS REPETICIONES, NO OCURRIENDO ASI CON EL CONTROL NEGATIVO.



**Cuadro 5.** INHIBICION BACTERIANA A LOS TRES MINUTOS DE EXPOSICION A LOS IRRIGANTES EVALUADOS

	UFC/mL Post Irrigación	% Erradicación
CLORHEXIDINA	0	100
	0	100
	0	100
CETRIMIDA / CLORHEXIDINA	400	99.99
	310	99.99
	180	99.99
CONTROL NEGATIVO (SUERO FISIOLÓGICO)	92.16 x10 <sup>6</sup>	28
	97.28 x10 <sup>6</sup>	24
	93.44 x10 <sup>6</sup>	27

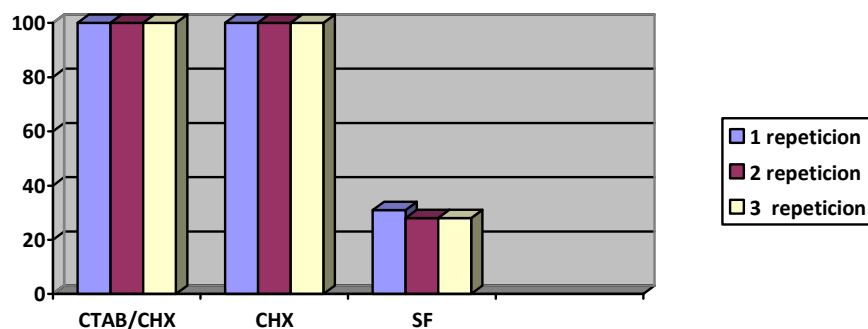
**GRÁFICO 5:** SE OBSERVA QUE A LOS 3 MINUTOS DE EXPOSICION; CLORHEXIDINA 2% Y CETRIMIDA / CLORHEXIDINA 15%/0.15% ERRADICARON LOS BIOFILMS DE ENTEROCOCCUS FAECALIS EN TODAS LAS REPETICIONES, NO OCURRIENDO ASI CON EL CONTROL NEGATIVO.



**Cuadro 6.** INHIBICION BACTERIANA A LOS CINCO MINUTOS DE EXPOSICION A LOS IRRIGANTES EVALUADOS

	UFC/mL Post Irrigación	% Erradicación
CLORHEXIDINA	0	100
	0	100
	0	100
CETRIMIDA / CLORHEXIDINA	10	99.99
	0	100
	30	99.99
CONTROL NEGATIVO (SUERO FISIOLÓGICO)	$88.32 \times 10^6$	31
	$92.16 \times 10^6$	28
	$92.16 \times 10^6$	28

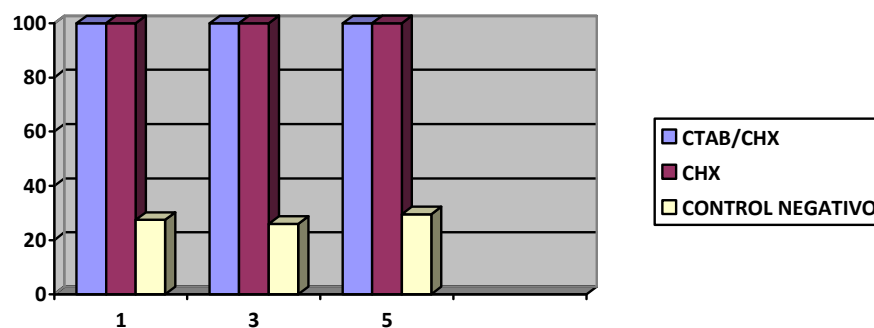
**GRÁFICO 6:** SE OBSERVA QUE A LOS 5 MINUTOS DE EXPOSICION ; CLORHEXIDINA 2% Y CETRIMIDA / CLORHEXIDINA 15%/0.15% ERRADICARON LOS BIOFILMS DE ENTEROCOCCUS FAECALIS EN TODAS LAS REPETICIONES, NO OCURRIENDO ASI CON EL CONTROL NEGATIVO.



**Cuadro 7.** EFECTIVIDAD A LOS **TRES TIEMPOS** DE EXPOSICION EVALUADOS ; según IRRIGANTES

		UFC/mL Post Irrigación MIN	UFC/mL Post Irrigación MÁX	MEDIA	% EFECTIVIDAD Promedio
CLORHEXIDINA	1 MIN	0	0	0	100 %
	3 MIN	0	0	0	100 %
	5 MIN	0	0	0	100 %
CETRIMIDA / CLORHEXIDINA	1 MIN	10	1260	635	99.99 %
	3 MIN	180	400	280	99.99 %
	5 MIN	0	30	15	99.99 %
CONTROL NEGATIVO  (SUERO FISIOLÓGICO)	1 MIN	$89.60 \times 10^6$	$96.00 \times 10^6$	$92.80 \times 10^6$	27.50 %
	3 MIN	$92.16 \times 10^6$	$97.28 \times 10^6$	$94.72 \times 10^6$	26.00 %
	5 MIN	$88.32 \times 10^6$	$92.16 \times 10^6$	$60.24 \times 10^6$	29.50 %

**GRÁFICO 7:** SE OBSERVA QUE DE LA COMPARACION ENTRE LOS IRRIGANTES EVALUADOS; CETRIMIDA/CLORHEXIDINA 15%/0.15%, FUERON MUY EFECTIVOS A COMPARACION DEL CONTROL NEGATIVO QUE ALCANZO VALORES MENORES AL 30 % DE EFECTIVIDAD.



## DISCUSION

Numerosas investigaciones se han realizado encaminadas a la búsqueda de nuevos irrigantes capaces de erradicar al *Enterococcus faecalis*, sin embargo, se han venido evaluando sobre cultivos planctónicos que no se asemejan a la realidad. La resistencia de esta bacteria reside ampliamente en su capacidad de crecer como biofilms en las paredes del conducto radicular. Basándonos en la escasez de de publicaciones sobre biofilms de *Enterococcus faecalis*, se consideró conveniente emplear el modelo de biofilm descrito por Anne Williamson en 2009 (11), en el cual, sobre porta-objetos de cristal, incubados durante 24 horas, proporcionaron biofilms consistentes similares a los encontrados en la presente investigación. En la actualidad existen pocos estudios que examinen el potencial sinérgico de cetrimida en asociación con Clorhexidina contra biofilms de *Enterococcus faecalis*, situación que nos llevo a ensayarlo experimentalmente.

Fuguen en el 2000 (20), dentro de su estudio sobre tension superficial de irrigantes, empleó a Cetrimida 0.2%; observándose la menor tensión superficial en comparación con otros irrigantes habituales. En la presente investigación se ensayó con la misma asociación: Cetrimida-Clorhexidina pero a diferentes concentraciones (15%/0.15%), coincidiendo los resultados con los anteriores investigadores. De igual manera, Arias en 2009 (22) se valió de los mismos irrigantes pero a concentraciones menores al 1%; mientras que Portenier y colaboradores en 2006 (21); verificaron que la asociación Cetrimida /Clorhexidina al 0.1% y 0.01% lograron erradicar biofilms de *Enterococcus faecalis*; ambas investigaciones utilizaron tiempos menores a 1 minuto.



Oncag, en el 2003 (23) obtuvo mayor efectividad en la erradicación de biofilms de *Enterococcus faecalis* con Cetrexidin (Clorhexidina 0.2% / Cetrimida 0.2%) frente a Hipoclorito de sodio 5.25%; comprobando su actividad antibacteriana debido a su elevado poder residual en el tiempo.

Por otro lado, Clorhexidina 2% también mostro gran efectividad como lo corroboró Davis y colaboradores en 2007 (82) frente a otros irrigantes usados.

Los resultados hallados en el presente estudio, mostraron que a pesar que en nuestro país la comercialización de cetrimida está poco difundida y se expende asociada a Clorhexidina bajo el nombre SAFEBLON al 15%/0.15%; se logró obtener resultados similares a los encontrados por los investigadores citados en los párrafos anteriores.

## CONCLUSIONES

1. La efectividad en la erradicación de biofilms de *Enterococcus faecalis* fue 99.99% con Ceftriaxona/ Clorhexidina (15%/0.15%), durante los tiempos evaluados.
2. La efectividad en la erradicación de biofilms de *Enterococcus faecalis* fue 100% con Clorhexidina 2%, durante los tiempos evaluados.
3. Por lo tanto, la efectividad entre ambas soluciones irrigadoras fue alta y similar para la erradicación de biofilms de *Enterococcus faecalis*.

## RECOMENDACIONES

1. Se recomienda llevar a cabo pruebas de toxicidad de Cetrimida en seres vivos; previa extrapolación para su uso como irrigante en pacientes humanos.
2. La dirección futura para el estudio, involucrando el efecto de irrigantes específicos en los biofilms, debe incluir la estandarización de modelos de biofilm, simulando ampliamente las condiciones existentes en los conductos radiculares.
3. Futuras investigaciones pueden ser orientadas a biofilms poli-microbianos y la eficacia de varias formulaciones antimicrobianas debido a la existencia de comunidades complejas de microorganismos en el sistema de conductos radiculares.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <sup>1</sup> El Karim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 103: 560-9
- <sup>2</sup> Ramachandran Nair PN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* 1987; 13: 29-39
- <sup>3</sup> Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia EA. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 2007; 33: 852-5
- <sup>4</sup> Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2006; 32: 527-31.
- <sup>5</sup> Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod* 2006; 32: 434-7
- <sup>6</sup> Sena Nt, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single species biofilms. *Int Endod J* 2006; 39: 878-85
- <sup>7</sup> Spratt DA, Pratten Wilson M, Gulabivala K. An in vitro evaluation of antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms canal isolates. *Int Endod J*. 2001; 34: 300-7
- <sup>8</sup> Lima KC, Fava LR, Siqueira JF. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilm to some antimicrobial medications. *J Endod* 2001; 27: 616-9
- <sup>9</sup> Cloete TE, Jacob L, Brozel VS. The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation* 1998; 9: 23-37
- <sup>10</sup> Viera DB, Carmona-Ribeiro AM. Cation lipids and surfactants as antifungal agents: mode of action. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 760-7
- <sup>11</sup> Peciuniene V, Teynaud, Balciuniene Y, Haapasalo. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root filled-teeth with chronic apical periodontitis. *International Endodontics journal* 2003; 34: 429-34.
- <sup>12</sup> Chavez de Paz L, Dalién G, Molander A, Moller A, Bergenholz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *International Endodontic Journal* 2003; 36: 500-8
- <sup>13</sup> Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles Dr, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* 2005; 31: 30-6
- <sup>14</sup> Hems RS, Gulabivala, Ng YL, Ready D, Spratt DA. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2005; 38: 22-29.
- <sup>15</sup> Sena Nt, Gomes BPFA, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza Filho. FJ. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single species Biofilms. *Int Endod Journal* 2006; 39: 878-85.

- 
- <sup>16</sup> Giardino L , Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia EA. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD and TETRACLEAN against *Enterococcus faecalis* biofilm J Endod 2007;33: 852-5.
- <sup>17</sup> Bryce G, Ready D, Donell DO, Ng P, Pratten J, Gulabivala K. Biofilm disruption by root canal irrigants and potential irrigants. Int. Endod J 2008; 41:814-5.
- <sup>18</sup> Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis* . J Endod 2007; 33: 815-8.
- <sup>19</sup> Cameron JA. The effect of fluorocarbon surfactant on the surface tension of endodontic irrigant, sodium hypochlorite. A preliminary report. Aust Dent J 1986;31:364-8.
- <sup>20</sup> Fügen Taşman, Zafer C. Çehreli, Canan Oğan, İlker Etikan, Surfactant tension of root canal irrigants .JOE 2000; 26:586-7
- <sup>21</sup> Portenier I, Waltimo T, Orstavik D, Haasapalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. J Endod 2006; 32:138-41.
- <sup>22</sup> Teresa Arias Solis. Suceptibilidad de *Enterococcus Faecalis* a soluciones irrigadoras de uso endodontico Tesis Doctoral . 2009
- <sup>23</sup> Oncag, Hosgor, Hilmioglu, Zequioglu, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. International Endodontic Journal 2003;36:423-32
- <sup>24</sup> Andrewes EW, Horder TJ A study of the streptococci pathogenic for man . Lancet 1906;11:708-13, 775-82.
- <sup>25</sup> Schleifer KH, Kilpper-Balz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. Rev. as *Enterococcus faecalis* comb. Nov. and *Enterococcus faecium* comb. Nov. Int J Syst Bacteriol 1984;34:31-4.
- <sup>26</sup> Piard JC, Jc, Desmazeaud M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. I. Oxygen metabolites and catabolism endproducts. Lait 1992; 71:525-41.
- <sup>27</sup> Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis* : its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment J Endod 2006; 32:93-8
- <sup>28</sup> Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21 st century. Cell Mol Life Sci 2003; 60:2622-36.
- <sup>29</sup> Rocas IN, Siqueira JF, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. J Endod 2004 ; 30:315-20.
- <sup>30</sup> Love RM. *Enterococcus faecalis* : a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J 2001; 34:399-405.
- <sup>31</sup> Orstavick D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. Endod Dent Traumatol 1990; 6:142-9.
- <sup>32</sup> Distel J, Hatton J, Gillespie J. Biofilm formation in medicated root canals. J Endod. 2002; 28:689-93.

- 
- <sup>33</sup> Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987; 66:1675-9.
- <sup>34</sup> Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 95-101.
- <sup>35</sup> Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological Status of root filled teeth with apical periodontitis. *Int. Endod Journal* 1998; 31:1-7.
- <sup>36</sup> Sudqvist G, Fidgor D, Persson S, Sjogren. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85:86-93.
- <sup>37</sup> Peculiene V, Balciuniene I, Ericksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root filled-canals in a Lithuanian population. *J Endod* 2000; 26:593-5.
- <sup>38</sup> Peculiene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeast and enteric bacteria in root filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int. Endod J* 2001 ; 34: 429-34.
- <sup>39</sup> Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American Population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91: 579-86.
- <sup>40</sup> Pinheiro ET, Gomez BP, Ferraz CC, Sousa EL, Texeira FB, Sousa-Filho FJ. Microorganisms from Canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003;36:1-11.
- <sup>41</sup> Pinheiro ET, Gomez BP, Ferraz CC, Sousa EL, Texeira FB, Sousa. Evaluation of root canal microorganism isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral microbial Immunol* 2003;18:100-3.
- <sup>42</sup> Gomez BPFA, Pinheiro ET, Gade - Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, Texeira FB. Microbiological examination of infected dental roots Canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:71-6.
- <sup>43</sup> Danese P, Pratt L, Kolter R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* 2000; 182:3593-6
- <sup>44</sup> Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 2000;182:2675-9
- <sup>45</sup> Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;20:1257-73.
- <sup>46</sup> Aldana LF, Sarassa SP 1999, Efecto de desinfectantes y antimicrobianos naturales frente a cepas de *L. monocytogenes*. *Microbiologia Industrial*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá.
- <sup>47</sup> Decho, A. Microbial Biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* 2000; 20:1257-73.
- <sup>48</sup> Liu H, Herbert HP, Fang HP. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J. Biotechnol* 2002;95:249-56.
- <sup>49</sup> Hoppe HG. Microbial extracellular enzyme activity: a new key parameter in aquatic ecology. In: *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. Springer. Berlin; 1991:60-83.

- 
- <sup>50</sup> Whitfield C, Valvano MA. Biosynthesis and expressions of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. *Adv Microb Physiol* 1993;35:135-246
- <sup>51</sup> Potts M, Desiccation tolerance of prokariotes. *Microbiol Rev* 1994;58:755-805.
- <sup>52</sup> Decho, A. Microbial Biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* 2000; 20: 1257-73.
- <sup>53</sup> Stewart PS, Grab L, Diemer JA. Analysis of biocide transport limitation in an artificial biofilm system. *J Appl Microbiol* 1998;85:495-500
- <sup>54</sup> Huang Ct, Yu FP, McFeters GA, Stewart PS. Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within Biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61:2252-6
- <sup>55</sup> Cloete TE, Resistance mechanism of bacteria to antimicrobial compounds. *Int Biodeterioration Biodegradation* 2003; 51:277-82.
- <sup>56</sup> George S, Kisben A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *E. faecalis*. *J Endod* 2005; 31: 867-72.
- <sup>57</sup> Distel J, Hatton J, Gillespie J. Biofilm formation in medicated root Canals *J Endod*, 2002; 28:689-93
- <sup>58</sup> Hubble TS, Hatton J, Gillespie J. Influence of *E. faecalis* proteases and the collagen-binding protein, ACE, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 121-6.
- <sup>59</sup> Abdullah M, Ng YI, Gulabiala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *E. faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* 2005; 31:30-6.
- <sup>60</sup> Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: Why well treated teeth can fail.
- <sup>61</sup> Takemura R, Noiri Y, Ehara A, Kawahara. Single species biofilm forming ability of root canal isolates on gutta percha points. *Eur J Oral Sci* 2004;112:523-9.
- <sup>62</sup> Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent res* 1977;85:255-65.
- <sup>63</sup> Jeanson MJ, White RR. A comparison of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod* 1994; 20:276-8
- <sup>64</sup> Cervone F, Tronstad L, Hammond B. Antimicrobial effect of chlorhexidine in a controlled release delivery system *Endod Dent Traumat*, 1990; 6 :33-36
- <sup>65</sup> D Arcangelo, Camilo, Vavara, Guisepe. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic, anaerobic, obligate anaerobic and microaerophilic bacteria. *J Endod*, 1999 May, v.25n.5 p.351-353.
- <sup>66</sup> Leonardo MR, Filho MT, Silva LAB. In vitro antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod* 1999; 25: 167-171.
- <sup>67</sup> Jiménez Polanco P, Navarro Majo JL, Murgia, Murtra Ferrer J: estudio de la Morfología y composición del barro dentinario. *Oris* 1992; 1: 19-27.
- <sup>68</sup> Bral M, Brounstein N, Antimicrobianos y Enfermedades Periodontales. *Clínicas Odontológicas Norteamericanas*; Ed. Interamericana ;1988, 2: 234-239.

- 
- <sup>69</sup> Harrison JW, Wagner GW, Henry CA. Comparison of the antimicrobial Effectiveness of regular and fresh scent Clorox. J Endod. 1990 v. 16 n. 7 ,p. 228-230
- <sup>70</sup> Pupo J, Biral RR, Almeida OP. Atividade antimicrobiana de solucoes para irrigacao de canais radiculares. Rev Gauch Odontol 1994, v.42, n. 1 p 17-19
- <sup>71</sup> Engstrom B, Lundberg M. the correlation between the positive cultures and the prognosis of the root canal therapy after pulpectomy. Odontol Revy. 1965; 16:193-203
- <sup>72</sup> Jeansonne M . A comparison of 2.0 % chlorhexidine gluconate and 5.25 % sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. J Endod 1994;20(6): 276-278.
- <sup>73</sup> Lekshmy DS, Kamath PM. Antimicrobial efficacy of 0.2 and 2 percent chlorhexidine and sodium hypochlorite as root canal irrigants: an in vivo study. Endodontology, 2001dec; 13(2): 57-62
- <sup>74</sup> Nava y Romero N; Uso de la clorhexidina en Odontología . PO ; 1995, 16:18-26.
- <sup>75</sup> Walton, Richard; Torabinejad, Mahmoud. Principles and practice of endodontics. Second Edition WB. Saunders Company 1996. Cap 16. Pag. 277.
- <sup>76</sup> <http://zeth.ciencias.uchile.cl/~amartinez/2006/seminario/2.pdf>
- <sup>77</sup> Merianos JJ. Cuaternary ammonium antimicrobial compounds. En Block SS, (ed.), Desinfection, Sterilization and Preservation. Philadelphia: Lea and Febiger, 1991; 225-62
- <sup>78</sup> Russell AD, Chopra I. Understanding antibacterial action and resistance. 2 ed. Horwood. Chichester; 1996.
- <sup>79</sup> Kugler R, Bouloussa O, Rondelez F. Evidence of a charge density threshold for optimum efficiency of biocidal cationic surfaces. Microbiology 2005; 151: 1341-8
- <sup>80</sup> Campanha MTN, Mamizuka EM, Carmona Ribeiro AM. Interactions between cationic liposomes and bacteria : The physicalchemistry of the bactericidal action. J Lipid Res 1999; 40: 1495-500.
- <sup>81</sup> Portenier I, Waltimo T, Haapasalo M. Killing of Enterococcus faecalis by MTAD and Chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. J Endod 2006; 32:138-41.
- <sup>82</sup> Davis J, Maki J, Bahcal J. An In Vitro Comparison of the Antimicrobial Effects of Various Endodontic Medicaments on Enterococcus faecalis . Journal of Endodontics 2007;33(5),567-569



---

## **ANEXOS**

## FICHA DE RECOLECCION DE DATOS

[illegible]

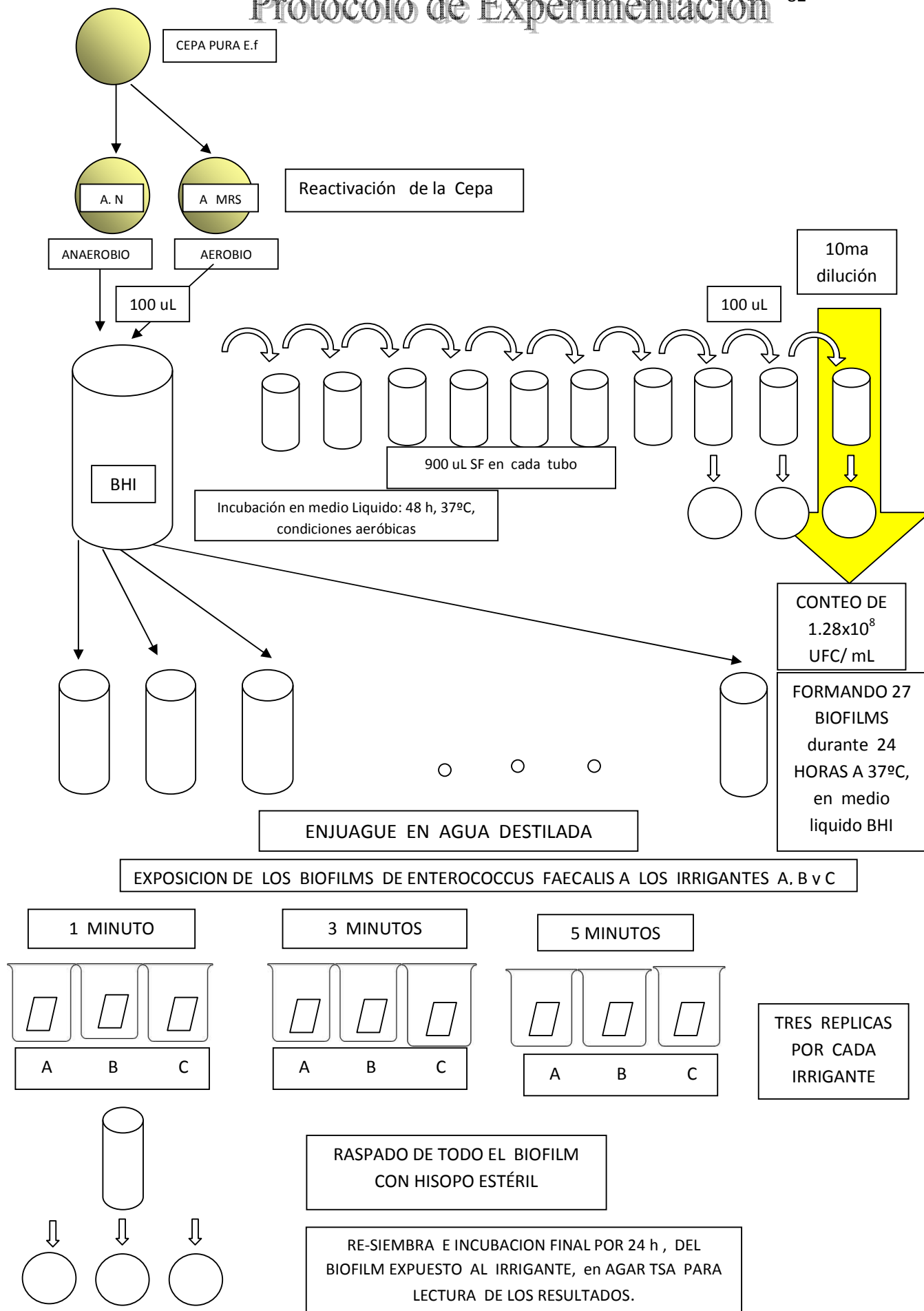


Fig 12. Inoculación de la cepa pura de *Enterococcus faecalis* al medio de cultivo líquido Infusión Cerebro-Corazón. (BHI). A. Asa de siembra al rojo vivo. B. Cosecha de colonias de *Enterococcus faecalis* a partir de la cepa pura. C. Inoculación de las bacterias en BHI. D. Incubación por 24 horas a 37°C en condiciones aerobias.

**A**



**B**



**C**



**D**



Fig 13. Formación de biofilms, a partir del cultivo puro en suspensión de *Enterococcus faecalis*. A. Caldo en suspensión con *Enterococcus faecalis*. B. Tubos de ensayo conteniendo 15 mL BHI estéril, C. Desenvolviendo las láminas porta objeto estériles listas para la formación de biofilms. D. Colocación de la lámina porta objeto en los tubos de ensayo con BHI estéril. E y F. Inoculación con alícuotas de 100 microlitros de *Enterococcus faecalis* del cultivo en caldo hacia cada tubo de ensayo con lamina porta-objeto G y H. Mostrando los tubos de ensayo inoculados con alícuota de *E. faecalis*. posterior a ello se incubo por 24 horas, 37 °C y en condiciones aerobias.



A



B



C



D



E



F

**G**



**H**



Fig 14 . Cuantificación preoperatoria de bacterias de *Enterococcus faecalis* mediante el método de diluciones seriadas.

**A**



**B**



**C**



Figura 15. **Cuantificación de UFC/mL antes de ser expuestas a los irrigantes**, A. Dilución  $10^{-8}$ . B. Dilución  $10^{-9}$ . C. Dilución  $10^{-10}$  (de esta última placa se realizó el conteo, por encontrarse más legible).

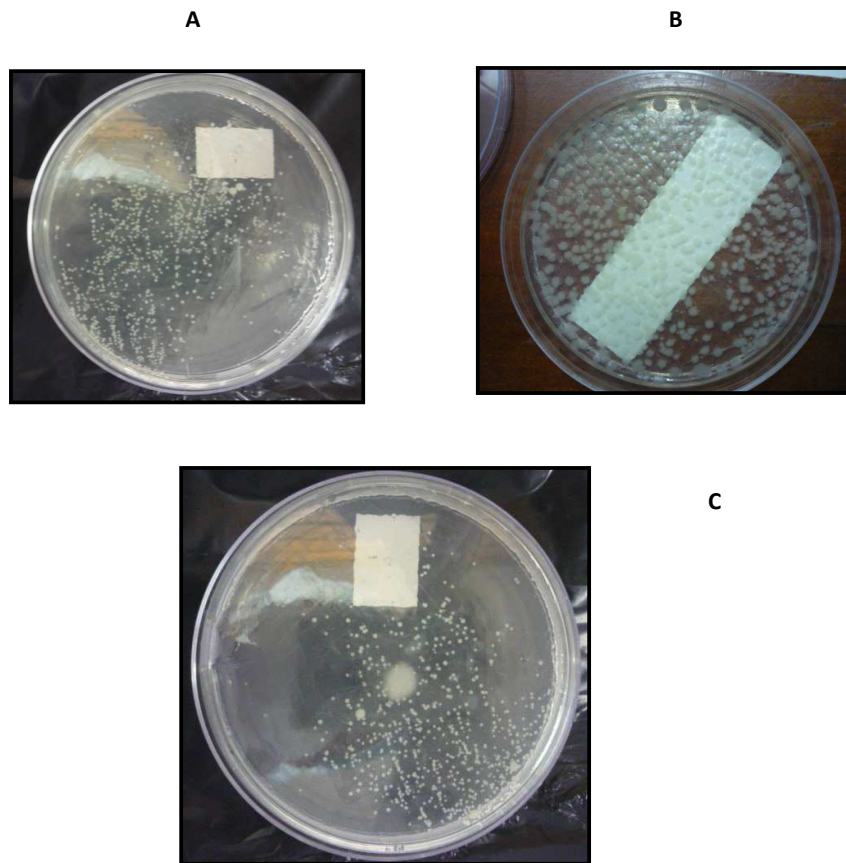


Figura 16. Esterilización adicional de los vasos herméticos estériles mediante luz ultravioleta; dentro de la cámara de flujo laminar.



Figura 17. Irrigantes a ser evaluados CLORHEXIDINA 2% (A) y SAFEBLON (Cetrimida/Clorhexidina 15% /0.15%) (B) frente a biofilms de *Enterococcus faecalis*.





A



B

Figura 18. **Enfrentamiento de biofilms a los Irrigantes.** A. Clorhexidina 2%. B. Cetrimida/ Clorhexidina 15% / 0.15% C. Toda la experiencia se llevo a cabo en cámara de flujo laminar. D y E. Sumergiendo las láminas con biofilms en los envases con irrigantes según los tiempos evaluados. F. Enjuague de los biofilms con 1 mL de agua destilada G. Frotando vigorosamente para desprender todos los biofilms mediante hisopos estériles. H. Inoculando 100 uL del biofilm desprendido en cada placa petri con TSA. I. Estriado del inóculo para la lectura final de UFC/mL luego de la incubación por 24 horas.

A

B





C

D



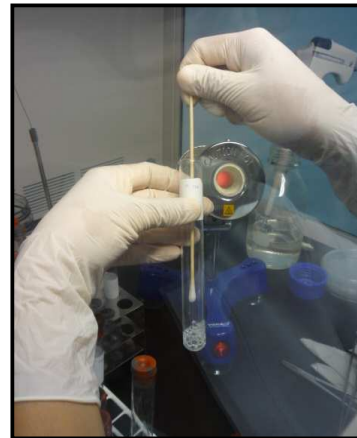
E



F



G



H

I

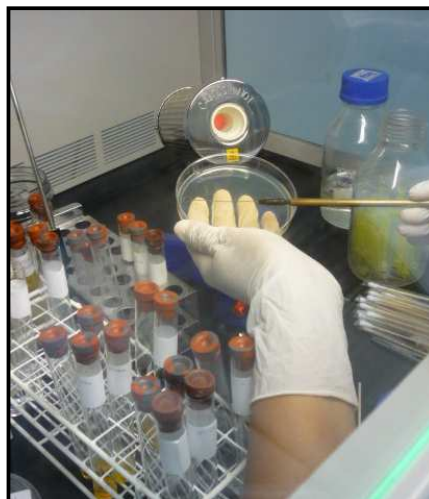
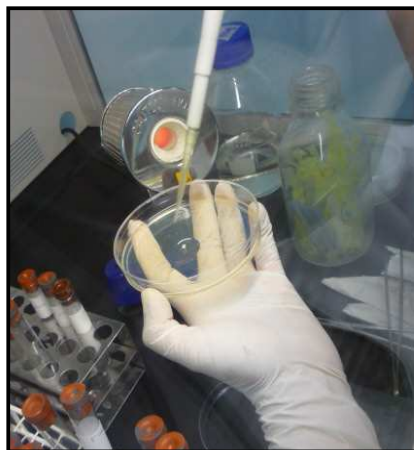
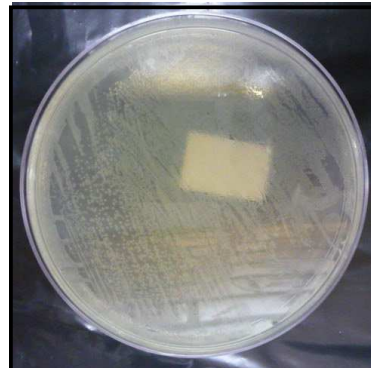


Figura19. Lectura final de las UFC/mL luego de la exposición a los irrigantes evaluados. A. grupo control(suero fisiológico) a los tiempos evaluados de (A-a1) 1,(A-a2) 3 y (A-a3) 5 minutos. B. Clorhexidina 2%.(B-b1) 1,(B-b2) 3 y (B-b3) 5 minutos y C. Cetrimida / Clorhexidina 15%/ 0.15% (C-c1) 1,(C-c2) 3 y (C-c3) 5 minutos .

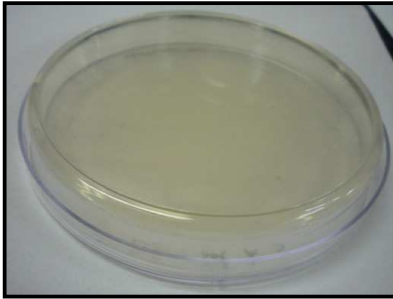
A-a1

A-a2

A-a3



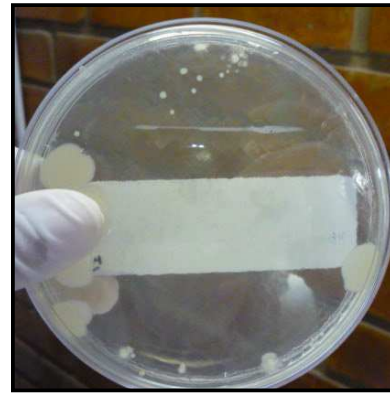
B-b1



B-b2



B-b3



C-c1



C-c2



C-c3